

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
VON PROTEINASE-INHIBITOREN
AUS ANEMONIA SULCATA**

Klaus Frank

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische
Biochemie der Universität München

Kommisarischer Leiter Prof. Dr. H. Fritz

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
VON PROTEINASE-INHIBITOREN
AUS ANEMONIA SULCATA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Klaus Frank

aus

Rosenheim

1975

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der
Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans Fritz

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 1975



Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. E. Werle bin ich für die Unterstützung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Fritz möchte ich für die Überlassung des Themas und seine Ratschläge, für seine Großzügigkeit und die freundliche Aufnahme in sein Laborteam sehr herzlich danken.

Herrn Dipl. Chem. G. Wunderer danke ich ganz besonders, da er mir stets mit fachlicher Anleitung hilfsbereit und freundlich zur Seite stand.

1. Einleitung

Das Thema der vorliegenden Arbeit ist die

Wirkung der

Wirkung der

2. Hauptteil

2.1. Einleitung

2.2. Zielsetzung

2.3. Methodik

2.4. Ergebnisse

2.5. Diskussion

2.6. Zusammenfassung

2.7. Literaturverzeichnis

2.8. Anhang

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

Bedeutung der Protein-Proteinasen-Inhibitoren

Unsere Aufgabenstellung

Besondere Stellung des Seeanemonen-Inhibitors im
Vergleich zum polyvalenten Trypsin-Kallikrein-
Inhibitor aus Rinderorganen (BPTI)

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Materialien und Definitionen

2. Methodik

Übersicht über das von uns verwendete Verfahren
zur Isolierung und Untersuchung der Seeanemonen-
Inhibitoren

3. Durchführung

3.1. Aufarbeitung der Seeanemonen und Trennung des
Rohinhibitorgemisches in drei verschiedene
Fraktionen

3.2. Getrennte Weiterverarbeitung von Fraktion I,
II und III und Auftrennung in mehrere Isoinhi-
bitoren

3.3. Weitere Reinigung der Isoinhibitoren durch Bin-
dung an Trypsin-Harz bzw. Chromatographie

3.4. Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung
der Isoinhibitoren
Strukturelle Untersuchungen
Kinetische Versuche

III. DISKUSSION

1. Biologie der Seeanemonen und Aspekte zur Physiologie der Inhibitoren
2. Chemie der Seeanemonen-Inhibitoren
 - 2.1. Isolierung
 - 2.2. Reinigung der Isoinhibitoren
 - 2.3. Ergebnisse der Struktur

Strukturelle Vergleiche der Seeanemonen-Isoinhibitoren 1 und 5-II mit dem BPTI, dem Schneckeninhibitor und dem Inhibitor aus Rinder-Kolostrum
 - 2.4. Hemmverhalten
 - 2.5. Reaktives Zentrum
3. Pharmakologische Betrachtungen

IV. ZUSAMMENFASSUNG

V. LEBENSLAUF

ABKÜRZUNGEN

ATEE	N-Acetyl-L-Tyrosin-Äthyl-Ester
BAEE	Benzoyl-L-Arginin-Äthyl-Ester
BAPA	Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilid
BPTI	Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor (Trypsin-Kallikrein-Inhibitor vom Rind)
IU	Inhibitor Units
U	Units
NPGb	p-Nitrophenyl-p'-Guanidobenzoat-Hydrochlorid
TPCK	Chlor-(N-Tosyl-L-Phenylalanyl)Methan

<u>Enzyme</u>	α -Chymotrypsin (EC 3.4.4.5)
	Trypsin (EC 3.4.4.4)
	Pankreaskallikrein (EC 3.4.4.21)
	Plasmin (EC 3.4.4.14)

I. EINLEITUNG

Protein-Proteinasen-Inhibitoren spielen in der gesamten belebten Natur eine bedeutsame Rolle. Es konnten aus verschiedensten pflanzlichen und tierischen Geweben phylogenetisch weit auseinanderliegender Entwicklungsstufen eine Reihe von Protein-Proteinasen-Inhibitoren isoliert werden und laufend werden neue entdeckt (1, 2, 3, 4, 5, 7).

Nach der Definition von LASKOWSKI und SEALOCK (3) sind Protein-Proteinasen-Inhibitoren Proteine, die mit einer oder mehreren Proteinasen reversible, stöchiometrische Komplexe bilden, in denen alle katalytischen Funktionen kompetitiv gehemmt sind. Diese Inhibitoren haben ein Molekulargewicht von 5000 bis 60000 und mehr und sind bis zum Molekulargewicht von 12000 im allgemeinen säure- und hitzestabil (5).

Die gehemmten Proteinasen sind meist Endopeptidasen (3). Man unterscheidet Inhibitoren unterschiedlicher Spezifitätsbreite. Monospezifische Inhibitoren hemmen jeweils nur ein für sie spezifisches Enzym, polyspezifische haben ein charakteristisches Hemmspektrum für mehrere Enzyme.

Obwohl über die physiologische Bedeutung vieler Inhibitoren noch keine Klarheit herrscht, macht man sich doch seit geraumer Zeit die pharmakologischen Wirkungen unter anderem des basischen polyvalenten Trypsin-Inhibitors aus Rinderorganen BPTI (unter den Handelsnamen Trasylol^R, Contrykal^R und Inipral^R bekannt) in der Medizin zunutze.

Und mußte man auch die Vorstellung über die therapeutische Wirkungsweise dieser Inhibitoren, etwa bei der Pankreatitis

zum Teil revidieren (bei experimenteller Pankreatitis konnte gar kein freies Trypsin nachgewiesen werden und offen bleibt vorerst, ob andere Enzyme beteiligt sind (6)), so wird besagter Inhibitor bei Indikationen wie Schock, Pankreatitis, Prophylaxe von postoperativen und posttraumatischen Zuständen und bei hyperfibrinolytischen Blutungen in hohen Dosen in der Praxis vielfach angewandt (8, 9, 40, 41).

Der basische Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen, 1936 von KUNITZ (12) aus Rinderpankreas isoliert, zeichnet sich durch eine besondere Temperatur-, Säuren- und Peptidasenstabilität aus (10, 11, 12). Er wurde 1929 zum ersten Mal von KRAUT, FREY und WERLE (13, 14) in Lymphknoten, Milz, Leber und Parotis gefunden. Seine Tertiärstruktur, welche unter anderem für die hohe Aktivität und Stabilität des Inhibitors verantwortlich gemacht wird, wurde von HUBER und Mitarbeitern aufgeklärt (15).

In jüngster Zeit wurden aus Seeanemonen (*Anemonia sulcata*) und Schnecken (*Helix pomatia*) (17) polyvalente Protein-Proteinasen-Inhibitoren isoliert, die deshalb so interessant erscheinen, weil sie bezüglich Hemmspektrum (Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Serum- und Pankreaskallikrein), Primärstruktur und Stabilität weitgehend dem basischen Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen gleichen.

Der polyvalente Proteinasen-Inhibitor aus *Anemonia sulcata* wurde bereits von BERESS (18) isoliert und von FRITZ et al (2) über CM-Cellulose in fünf Isoinhibitoren aufgetrennt.

KORTMANN konnte aus einem Gemisch von Seeanemonen, welches auch *Anemonia sulcata* enthielt, nach Ionenaustausch-Chromatographie an SP-Sephadex C-25 elf aktive Fraktionen unterscheiden. Er isolierte Isoinhibitoren aus einem Seeanemonengemisch aus der Nordsee und dem Mittelmeer und vermutete bereits, daß es quantitative und qualitative Unterschiede zwischen den Inhibitoren verschiedener Aktinaria-Arten geben müsse (19).

Von uns wurde der Seeanemonen-Inhibitor aus *Anemonia sulcata* erneut aufgegriffen mit dem Ziel, genügend Material einheitlicher Natur für Sequenzierungen zu gewinnen und mit Hilfe der Modifikation und Erweiterung der bekannten Isoliermethoden die Inhibitoren weiter zu reinigen und strukturell zu differenzieren. Dazu benutzten wir ökologisch einheitliche Seeanemonen aus der Bucht von Neapel, welche uns freundlicherweise von L. BÉRESS zur Verfügung gestellt wurden. Damit erzielten wir mit diesem Material und der hier beschriebenen Methode eine Erweiterung und Vertiefung der Ergebnisse vorhergegangener Arbeiten.

Die erstaunliche Ähnlichkeit des BPTI mit dem Seeanemonen-Inhibitorgemisch bezüglich des Hemmspektrums - wirkungsgleiche Inhibitoren in zwei phylogenetisch so weit auseinanderliegenden Spezies (Coelenteraten-Mamalia) - könnte für die Evolutionsforschung fruchtbare Anregungen enthalten (20). Spekulativ könnte man eine gemeinsame Grundstruktur annehmen, die sich im Laufe der Entwicklung mutagen wandelte. Die Ähnlichkeit erschöpft sich dabei nicht im Hemmspektrum, sondern erstreckt sich bis in den molekularen Bereich, wo die bisherigen Ergebnisse strukturelle Ähnlichkeit vermuten lassen.

Eine weitere Gemeinsamkeit zeigt sich im Verhalten des Seeanemonen-Inhibitors und des BPTI gegenüber Subtilisin und Thrombin: Diese Proteasen werden in ihrer Aktivität durch beide Inhibitoren nicht gehemmt (23).

Ein Unterschied zeigt sich jedoch im reaktiven Zentrum: Gehört der BPTI zu den sog. Lysin-Inhibitoren, so weist der Seeanemonen-Inhibitor im reaktiven Zentrum Arginin auf.

Eine weitere Divergenz fand sich bei der Untersuchung der Ausscheidung bei Ratten:

Während der polyvalente Trypsin-Inhibitor aus Rinderpankreas (i.v. injiziert) nur noch zu 10 % aktiv über die Niere ausgeschieden wird, konnte nach der Ausscheidung von Seeanemonen-Inhibitor noch 90 % der eingesetzten Aktivität im Harn gefunden werden (21).

Der Seeanemonen-Inhibitor weist einige spezifische Merkmale auf, die sonst bei keinem der bisher isolierten Inhibitoren mit gleichem Hemmspektrum wie dem des basisch polyvalenten Trypsin-Inhibitor BPTI gefunden werden konnten:

- a) In seinem Hemmverhalten gegenüber Trypsin zeigt er sich als temporärer Hemmstoff, d.h. er wird bei Inkubation mit Trypsin abgebaut, unter langsamer Freisetzung des Enzyms.
- b) Bei allen von E. REICH getesteten Hemmstoffen war der Inhibitor aus Seeanemonen der einzige, der den von REICH isolierten Plasminogen-Aktivator hemmt (22).

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Materialien und Definitionen

T r y p s i n , calciumstabilisiert, 4000 NF-Einheiten pro mg bzw. ca. 1 U (BAPA)/mg vom Rind (Novo Industri A/S)

Trypsin TPCK-behandelt, 2 U (BAPA)/mg (Merck A.G.)

α -C h y m o t r y p s i n , 1100 NF-Einheiten /mg bzw. ca. 50 mU (CPPN)/mg vom Rind (Novo Industri A/S)

P l a s m i n , 2,68 Novo-Einheiten /mg bzw. ca. 14 mU (BAPA)/mg vom Schwein (Novo Industri A/S)

K a l l i k r e i n aus Pankreas, (1150 biologische Kallikrein-Einheiten /mg) vom Rind, KZC 9601 (Bayer-Leverkusen)

S u b s t r a t e :

N α -Benzoyl-L-Arginin-Äthylester (BAEE)

N α -Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilid (BAPA)

N-Acetyl-Tyrosin-Äthylester (ATEE)

T r y p s i n h a r z :

Trypsin (vom Rind) polymer gebunden an CM-Cellulose; (Cristal. Trypsin Novo, dialyzed and lyophilized, 23.75 Anson Trypsin-Units per g, 4150 NF Units per g, Batch No. 271-5; CM-C-Hydrazid: Merck, Abl. 0090, N. 10,2 %)

SP-Sephadex C 25, Lot. Nr. 9066, Cap. 2,3 $\pm$ 0,3 meq/g; part. size 40 - 120 μ (Pharmacia)

Sephadex G 50 superfine; Lot. No. 7837, part. size 10 - 40 μ (Pharmacia)

DC-Fertigfolien F 700, Mikropolyamid; doppelseitig beschichtet ohne Bindemittel (Carl Schleicher und Schüll)

Definitionen

Enzymaktivität

Eine Einheit (U) entspricht der Enzymaktivität, welche die Spaltung von 1 Mikromol Substrat pro Minute unter genau festgelegten Versuchsbedingungen katalysiert (35).

Inhibitoraktivität

Eine Inhibitoreinheit (IU) entspricht der Inhibitoraktivität, welche eine Enzymeinheit (U) vollständig hemmt, d.h. die enzymkatalytische Substratspaltung pro Minute um 1 Mikromol Substrat reduziert.

Spezifische Inhibitoraktivität

Als spezifische Aktivität eines Inhibitors bezeichnen wir den Quotienten aus der jeweiligen Inhibitoraktivität (IU) und dem Wert einer definierten Proteingröße z.B. E_{280} , mg oder Mol.

Sämtliche Einheiten beziehen sich auf eine Meßtemperatur von 25 ° C.

2. Übersicht zur Methodik

Um ein Inhibitorgemisch aus Seeanemonen zu gewinnen, verwendeten wir eine von BERESS entwickelte Isolierungsmethode (18). Sie bringt zwei Vorteile: Einmal ist sie in kurzer Zeit durchführbar, zum anderen bringt sie eine hohe Anreicherung und gute Ausbeuten.

Wir modifizierten das Verfahren, um eventuelle zusätzliche saure Isoinhibitoren zu gewinnen. Dazu schufen wir drei Ausgangsfraktionen (s. Schema 1 u. Tab. 2) mit verschiedenem pH-Wert, welche nach gleichem Verfahren, aber getrennt aufgearbeitet wurden.

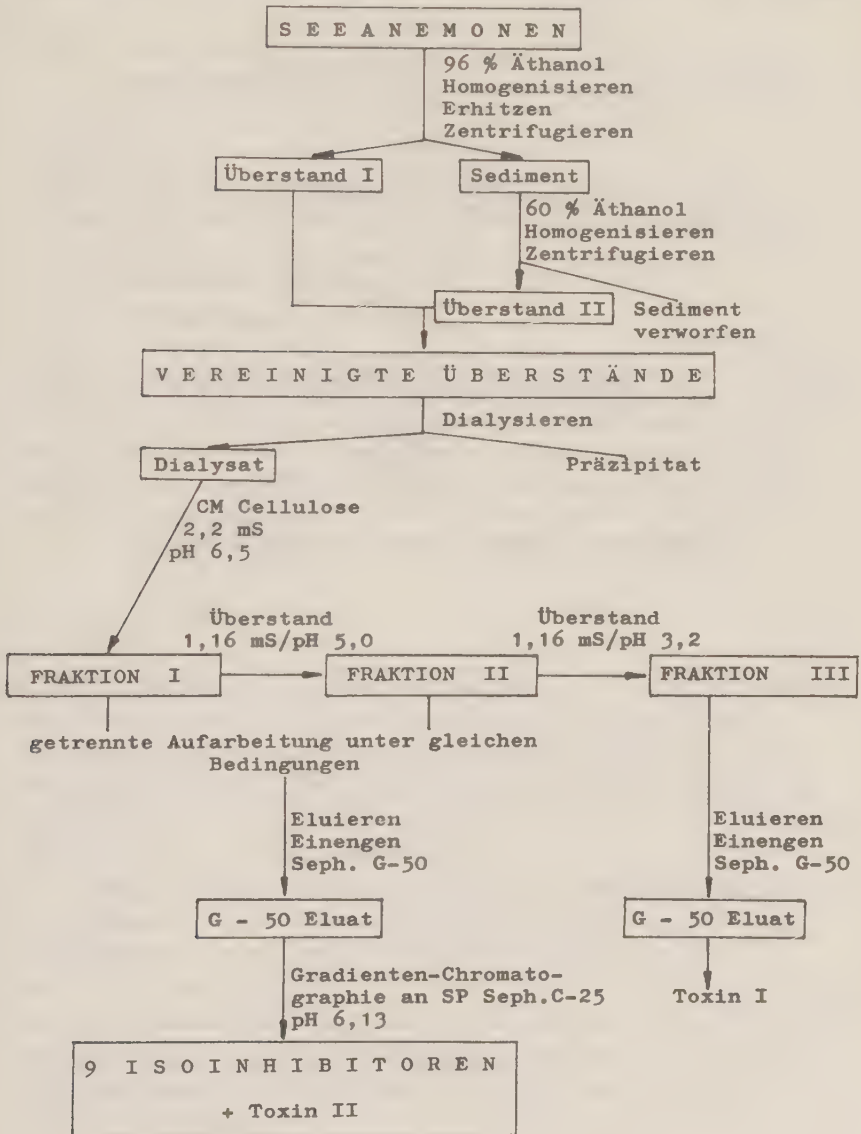
Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie konnten aus den einzelnen Fraktionen mehrere aktive Komponenten isoliert werden, welche nach weiterer Reinigung z.T. für kinetische Studien herangezogen wurden. Außerdem wurden strukturelle Untersuchungen durchgeführt.

Die Wahl verschiedener pH-Werte bei der Ionenaustausch-Chromatographie gibt dem Protein unterschiedliche spezifische Ladungen und erlaubt somit eine genauere Trennung als bei nur einem pH-Wert. Eine weitere Verbesserung der Trennung von Proteinen, die sich nur geringfügig in ihrer spezifischen Ladung unterscheiden, ist durch Verwendung der Gleichgewichtschromatographie (auch "Ionenaustausch-Chromatographie unter Startbedingungen" genannt) möglich.

Für unser Puffer-Elutions-System (Phosphatpuffer, Na^+ als Gegenion bei SP-Sephadex) war nur eine Bestimmung der Salzkonzentration nötig, was wir recht befriedigend mit Hilfe der Leitfähigkeit unter Verwendung von Eichkurven durchführen konnten.

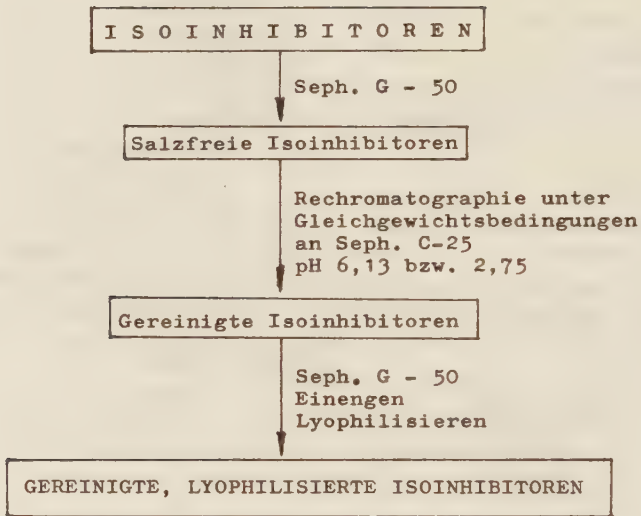
Schema 1

Isolierung von Seeanemonen-Inhibitoren



Schema 1

Fortsetzung



3. Durchführung

3.1. Aufarbeitung der Seeanemonen und Trennung des Rohinhibitorgemisches in drei verschiedene Fraktionen

Versuchsbeispiel:

Aufarbeitung von 2 kg meerwasserfeuchten Seeanemonen (*Anemonia sulcata*), entsprechend ca. 13 % Trockengewicht.

3.1.1. Vorbereitung

Die Seeanemonen wurden in der Bucht von Neapel von L. BÉRESS gesammelt, anschließend gereinigt und durch Zentrifugieren entwässert, wobei kein Verlust an Inhibitoren oder Toxinen aufgetreten war. Das Zentrifugat wurde tiefgefroren (-20°C) und so transportiert.

3.1.2. Extraktion

2 kg tiefgefrorene Seeanemonen werden mit 2 Liter 96 % Alkohol versetzt und 2 Min. im Waring Mixer homogenisiert (s. Tab. 2 Schritt 1). Das schmutzigbraune Homogenat wird unter Rühren 5 Min. lang im Wasserbad auf 65°C erwärmt und nach Abkühlen auf 25°C bei 8000 UPM (WKF 6'50K 6 x 11 Rotor) zentrifugiert (s. Tab. 2 Schritt 2).

Der inhibitor- und toxinhaltige, klare, rotbraune Überstand wird dekantiert, das grüne Zentrifugat erneut mit 1 Liter 60 % Äthanol 2 Min. homogenisiert und zentrifugiert (s. Tab. 2 Schritt 3).

Der entstandene Rückstand wird verworfen, die Überstände der beiden Extraktionen werden vereinigt (s. Tab. 2 Schritt 2 u. 3) und gegen 40 Liter demin. H_2O über Nacht dialysiert (s. Tab. 2 Schritt 4).

3.1.3. Anreicherung des Inhibitorgemisches durch Adsorption an CM-Cellulose

Fraktion I

Nach Einstellen des Dialysats (aus Schritt 4) auf 2,2 mS und pH 6,5 werden 60 g trockene CM-Cellulose 15 Min. lang eingerührt (pH nachgestellt), nach 4 stdg. Stehen abgesaugt (der Überstand wird in Fraktion II weiterverarbeitet), gewaschen und mit 1 M NaCl und 0,05 M TRIS, pH 8,0 eluiert (s. Tab. 2 Schritt 5).

Fraktion II

Der Überstand von Fraktion I wird mit Essigsäure auf pH 5 und durch Verdünnen mit H₂O auf 1,16 mS eingestellt. Nun werden wie bei Fraktion I 60 g CM-Cellulose eingerührt (pH nachgestellt) und nach 4 stdg. Stehen vom Überstand getrennt. Das an die Cellulose adsorbierte Protein wird wie bei Fraktion I eluiert (s. Tab. 2 Schritt 6).

Fraktion III Adsorption von Toxin I an SP-Sephadex

Nach Verdünnen des aus Fraktion II erhaltenen Überstandes (nach pH-Korrektur verdünnen bis zum Leitfähigkeitswert von 1,16 mS), wird der pH auf 3,2 eingestellt; dann werden 200 g H₂O-gequollenes SP-Sephadex eingerührt (pH nachgestellt) und nach 12 stdg. Stehen vom Überstand getrennt, der verworfen wird. Das an Sephadex adsorbierte Toxin II wird, wie oben beschrieben, eluiert (s. Tab. 2 Schritt 7).

Da diese Fraktion kaum Inhibitoraktivität zeigt, werden daraus nur Toxine isoliert.

3.1.4. Anreicherung der vorgereinigten Inhibitorgemische aus (3.1.3.) Fraktion I und II durch Gelfiltration an Sephadex G - 50.

Die Eluate aus (3.1.3.), Fraktion I und II werden getrennt aufgearbeitet. Da die gleiche Gelfiltrations-Prozedur für beide Eluate verwendet wird, wird sie hier nur einmal beschrieben.

Nach getrenntem Einengen der Eluate von Fraktion I und II durch Ultrafiltration (Amicon UM 05-Membran) werden sie auf eine Sephadex G-50-Säule (7 x 120 cm, 25° C, 180 ml/h und 15-20 ml/Fraktion, äquilibriert und entwickelt mit 2 % Essigsäure v/v) aufgetragen, wobei Inhibitorgemische und bei gleichem Elutionsvolumen auftretende Toxine von Farbstoffen und teilweise von anderen Begleitproteinen getrennt werden.

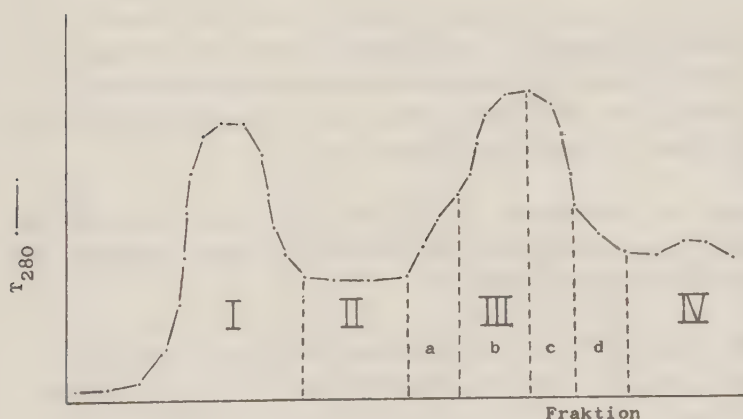


Abb. 1 Charakteristisches Elutionsdiagramm

Tabelle 1

Bereich	ml	Zusammensetzung
I	300	gefärbte hochmolekulare Substanzen
II	560	
III		Inhibitor und Toxin
a	250	Vorpeak
b u. c	750	Hauptpeak
d	200	Nachpeak
IV		u.a. niedermolekulares Toxin III

Nach Entsalzen von III c und III d über Sephadex G - 25 medium (5,6 x 120 cm, 120 ml/h, 12 ml/Fraktion, 25° C, 2 % Essigsäure v/v) werden die einzelnen Fraktionen getrennt lyophilisiert und gesammelt.

3.1.5. Anmerkungen zur beschriebenen Isolierungsmethode

- a) Die einzelnen Reinigungsschritte brachten jeweils 100 % Ausbeute. Ausnahme: Der Dialyseschritt 4, bei dem 13 % des Inhibitors an ausgefallenes Protein adsorbiert worden waren und nicht zu der hier beschriebenen Aufarbeitung verwendet werden konnten.
- b) Nach den Prozeduren 1 - 6' ist das Inhibitorgemisch bis zu 114-fach angereichert; es enthält außer Toxinen noch farblose Begleitproteine.
- c) Die nach Gelfiltration an Sephadex G - 50 erhaltenen Bereiche III a, b, c, d werden getrennt weiter verarbeitet.

Tabelle 2

Aufarbeitung von 2 kg Seeanemonen

Aufarbeitungsschritt Nr.	Bezeichnung	ml	Protein E ₂₈₀ nm	IU	IU E ₂₈₀	Anreicherungs- faktor A *	Ausbeute % B *
1	Homogenat (ca. 10°C) SPT	2 810	124 000	9 700	0,07	-	-
2	Homogenat 1 auf 65°C erwärmen 1. Elution SPT	2 810	133 500	8 300	0,062	-	-
3	Zentrifugat von 2, nach- eluiert SPT	980	17 150	1 200	0,07	-	-
2 + 3	Vereinigte Eluate von 2 und 3	3 750	150 000	9 700	0,065	1	100
4	Dialyse Dialysat	6 500	117 000	8 400	0,072		86,5
	Dialysewasser	40 000	21 600	68			0,7
5	CM-Cell. Eluiertes Frakt. I Adsorbat	1 570	1 670	6 550	3,92	60,5	67,5
	2,2 mS Überstand + pH 6,5 Waschwasser	18 000	106 000	1 600			

* A bezogen auf Schritt 2 + 3 = 1

* B bezogen auf Schritt 2 + 3 = 100 %

Tabelle 2 Fortsetzung

Nr.	Aufarbeitungsschritt Bezeichnung	ml	Protein E ₂₈₀ nm	IU	$\frac{\text{IU}}{\text{E}_{280}}$	Anreicherungs- faktor A *	Ausbeute % B *
6	CM-Cell. Eluiertes Frakt.II Adsorbat 1,16 mS Überstand + pH 5 Waschwasser	1 300 25 500	1 290 107 000	1 820 50	1,41 	21,7 	18,8
7	SP-Seph. Eluiertes Frakt.III Adsorbat	750	187	50	0,27		0,5
5'	1,16 mS pH 3,2 Überstand F-I-Eluat Konzentriert	52 000 56	55 000 1 680	0 6 400	 3,8	58	66
	Gelfiltration an Seph.G-50 Eluat 3 a 3 b 3 c 3 d	280 900 670 285	25 162 990 43	19 1 200 5 300 17,6	 7,4 5,35	114 82	66
6'	F-II-Eluat Konzentriert	53	1 270	1 840	1,45	22,2	16,9
	Gelfiltration an Seph. G-50 Eluat 3 a 3 b 3 c 3 d	210 730 200 130	31,5 390 386 57	15,5 1 170 615 10,5	 3 1,6	46 25	16,9

3.2. Getrennte Weiterverarbeitung von Fraktion I, II und III und Auftrennung in mehrere Isoinhibitoren

3.2.1. Auftrennung von Fraktion I Bereich III b in Isoinhibitoren

Der Bereich III b wurde gewählt, da dieser die höchste spezifische Aktivität aufwies.

Nach verschiedenen Vorversuchen wurden folgende Bedingungen gewählt (die hier stellvertretend für sämtliche Durchführungen anhand eines Muster-Elutionsdiagrammes aufgeführt werden sollen):

Die mit dem Ausgangspuffer (0,05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{HCl}$ pH 6,13 NaN_3 0,02 % w/v) äquilibrierte, mit SP-Sephadex gefüllte Säule (1,5 x 100 cm) wurde mit 2,80 g (entsprechend 4200 IU) des Inhibitorgemisches, gelöst in 42 ml des Ausgangspuffers, beladen, nachdem der pH und die Leitfähigkeit zwischen Puffer und Substanz zur Übereinstimmung gebracht worden waren.

Tabelle 3

	Substanz	Puffer
pH	5,85	6,13
Leitfähigkeit (Lf x 130,7) Ohm	$6,4 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-5}$

Nach dem Auftragen wurde mit ca. 200 ml Puffer nachgewaschen.

Die Elution erfolgte mit 5 l Puffer:

a) mit einem linearen Salzgradienten 100 - 400 mM Na^+
(4 l gesamt)

b) anschließend mit 400 - 800 mM Na^+ (1 l gesamt)

Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 50 ml/h betrug das Elutionsvolumen 9 ml pro Fraktion.

Die durchschnittliche Ausbeute betrug 92 % (85 - 98 %), bezogen auf die Inhibitoraktivität von Fraktion I bzw. Fraktion II.

Die einzelnen Isoinhibitoren wurden durch Vereinigen folgender Fraktionen gewonnen:

Das vor Peak 1 eluierte Protein wurde zur Toxingewinnung verwendet. Die Teilmengen zwischen den Peaks wurden zur weiteren Aufarbeitung gesammelt.

Die Volumina der einzelnen Peaks wurden im Rotationsverdampfer bei 25 - 30° C auf ca. 20 ml eingengt und mit Gelchromatographie über Sephadex G - 50 superfine (Säule 3,5 x 120 cm, Elutionspuffer 50 mM $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$ - eingestellt mit NH_3 auf pH 8,1, 1 % Butanol v/v, Elutionsgeschwindigkeit 50 ml/h, pro Fraktion 8 ml) vollständig entsalzt (Aktivitätsverlust < 5 %).

Die Salze traten stets getrennt vom Protein in einem zweiten Peak auf und wurden mit 5 % AgNO_3 w/v nachgewiesen (AgCl als weisser Niederschlag, $\text{Ag}_3 \text{PO}_4$ als gelber Niederschlag).

Nach erneuter Einengung der Volumina im Rotationsverdampfer auf 5 - 10 ml wurden die einzelnen Isoinhibitoren lyophilisiert.

3.2.2. Auftrennung der Fraktion II Bereich III a b

Es wurde prinzipiell gleich verfahren wie bei der Auftrennung der Isoinhibitoren aus Fraktion I an SP-Sephadex.

1,064 g des Inhibitorgemisches, entsprechend 1496 IU (spezifische Aktivität 1,4 IU/mg) gelöst in 17 ml des Ausgangspuffers (0,05 Mol Na_2HPO_4 , pH 6,13, NaN_3 0,02 %) wurden auf pH 6,05 eingestellt und auf die mit Anfangspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Der Salzgradient war analog zu demjenigen bei der Aufarbeitung von Fraktion I. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 49 ml/h, das Fraktionsvolumen 10,5 ml.

3.2.3. Anmerkungen zum beschriebenen Trennverfahren:

- a) Alle verwendeten Puffer wurden - wie angegeben - mit NaN_3 0,02 % oder Butanol 1 % versetzt, um Mikroorganismenwachstum vorzubeugen.
- b) Sämtliche Puffer wurden grundsätzlich unter Wasserstrahlvakuum entgast (ca. 1 Stunde), um Blasenbildung im Gradientenmischgefäß und der Säule zu vermeiden.
- c) Beim Angleichen der Leitfähigkeiten zwischen Puffer und aufzutragender Substanz konnte eine Differenz von $\pm 0,5 \times 130,7$ mho toleriert werden.
- d) Der pH der Proteinlösung wurde stets etwas saurer als der pH des Elutionspuffers eingestellt (höhere positive spezifische Ladung, d.h. stärkere Bindung an Kationenaustauscher).

Tabelle 4

Auswertung der Auftrennung von Fraktion I Bereich III b

(Substanz: 891 mg/14 ml; 2240 IU entsprechend 160 IU/ml;
E₂₈₀: 710)

Fraktion	ml	IU	%	E ₂₈₀	spez. Aktiv.*	Isoinhib. Peak
1- 72	875	112	5,0	160	0,7	Toxin
73- 78	73	58	2,4	50	1,16	(1)
79- 91)	220	169	7,5	47,4	3,6	"saurer Pool"
99-103						
92- 98	85	117	5,2	27	4,3	(2)
104-114	138	310	14,0	387	0,8	(3)
115-200	1070	410	18,5	140	2,93	(4)
201-214	176	545	24,4	525	1,04	(5)
215-232	218	108	4,8	46,7	5,05	(6)
233-280)	2100	122	4,3			"bas. Pool"
291-430						
281-290	125	72,5	3,2	14	5,18	(7)
431-437	87	6,65	2,8	8,8	0,75	(8)
446-448	23	1,24	0,5	13,5	0,17	(9)
			2031,4	93,6		

* Spez. Aktiv. = $\frac{\text{IU}}{\text{E}_{280}}$

Tabelle 5

Auswertung der Auftrennung von Fraktion II Bereich III a b

(Substanz: 1,064 g/17 ml 0,05 M Na₂ HPO₄, pH 6,13;
1496 IU entsprechend 88 IU/ml)

Fraktion	ml	IU	%	E ₂₈₀	spez. Aktiv.*	Isoinhib. Peak
1- 79	805	61	4,1	24	0,4	Toxin II
80-110	310	35	2,3	37	1,05	(1)
111-125	145	98	6,5	177	1,8	"saurer Pool"
126-138	126	78	5,2	257	3,3	(2)
139-152	136	209	14,0	249	1,2	(3)
153-212	602	307	21,0	676	2,2	(4)
213-234	318	438	29,0	525	1,2	(5)
235-257)						
273-305)	1280	76	5,1	156	3,4	"bas. Pool"
321-349)						
363-395						
258-272	148	45	3,0	156	3,4	(6)
306-312	63	24	1,6	75	3,1	(7)
313-320	74	6	0,4	2,4	0,4	(8)
350-362	126	3	0,2	0,3	0,1	(9)
		<u>1387</u>	<u>92,4</u>			

$$* \text{ Spez. Aktiv. } = \frac{\text{IU}}{\text{E}_{280}}$$

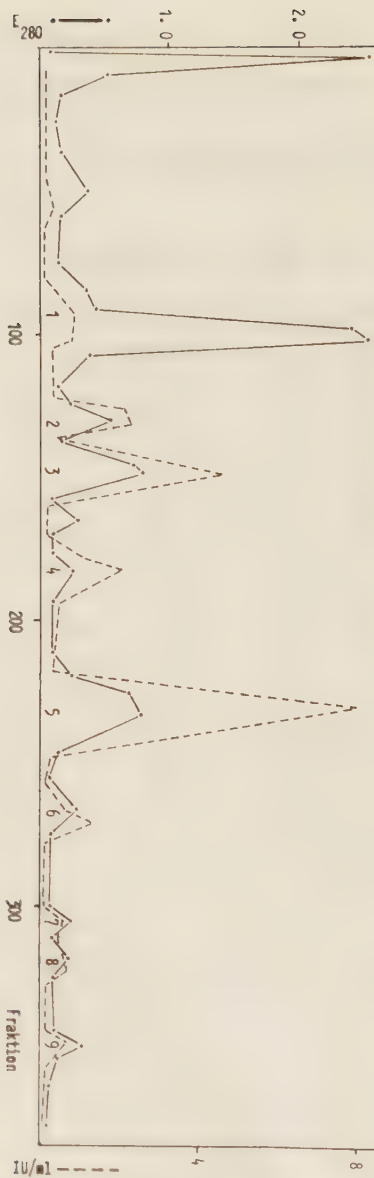


Abb. 3 Auftrennung von Frakt. II in Isoinhibitoren

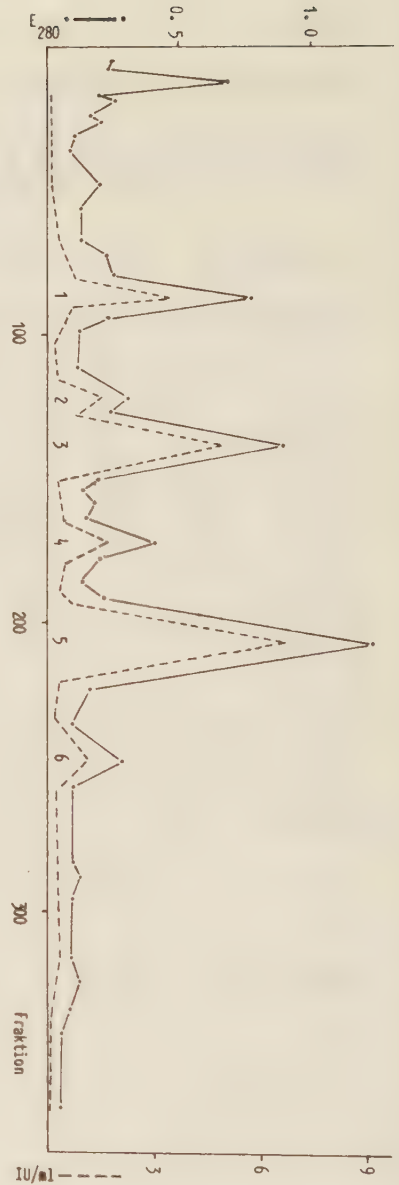


Abb. 2 Auftrennung v. Frakt. I in Isoinhibitoren

3.3. Weitere Reinigung der Isoinhibitoren

3.3.1. Spezifische Bindung von Fraktion I Peak 1 an Trypsinharz

Da Peak 1 eine besonders niedrige spezifische Aktivität aufweist, wurde er spezifisch an Trypsin - kovalent gebunden an CM-Cellulose - gebunden und gereinigt. Störende Begleitproteine konnten damit abgetrennt werden. Die Gefahr der Spaltung war von sekundärer Bedeutung, da der Isoinhibitor nicht für Sequenzstudien verwendet werden sollte.

Das aktive Zentrum des an die Cellulose gebundenen Trypsins bleibt noch so weit frei, daß es ungehindert mit dem Inhibitor einen Komplex bilden kann, welcher u.a. durch die Affinität des Inhibitors zum Trypsin und durch ionische Kräfte zustande kommt. Dieses Verfahren wurde erstmals von LEVIN (26) beschrieben. FRITZ und Mitarbeitern gelang es dann, diesen Effekt zur Isolierung auszunutzen (7,27,28).

3 g Trypsin-Cellulose wurden mit Puffer (Tra 0,1 M; pH 7,8) 5 mal jeweils 30 Min. lang gewaschen (eingerührt und abzentrifugiert). Gebunden wurden 20 mg (entsprechend 64 IU) des Lyophilisats Fraktion I Peak 1 gelöst in 2 ml Puffer, durch einstündiges Einrühren bei 4° C. Anschließend wurden in der Kühlzentrifuge (4° C) 10 Min. bei 4800 UpM (3000 g) zentrifugiert und der Überstand ausgetestet.

Jetzt wurde nachgewaschen, 5 mal mit je 10 ml Tra pH 7,8, 5 mal mit Tra pH 5,0 (jeweils 10 Min.).

Sämtliche bisher durch Zentrifugieren entstandenen Überstände waren frei von Aktivität, d.h. die Substanz war zu 100 % an die Trypsin-Cellulose gebunden.

Nach Titrieren der Suspension mit 2 N HCl auf pH 1,8 erfolgte Eluieren mit HCl/KCl-Lösung (0,4 M KCl, pH 1,8) insgesamt 3 mal mit je ca. 13 ml. Dabei konnten 48 IU entsprechend 75 % der aufgetragenen Substanzmenge zurückgewonnen werden. Nach Umstellen des Eluats auf pH 7,5 mit 2 N NaOH wurde der so gereinigte Isoinhibitor entsalzt und lyophilisiert.

Tabelle 6

	ml	IU	%
aufgetragen	2	64	100
abzentrifugiert	10	-	-
gewaschen bei pH 7,8	50	-	-
bzw. pH 5,0	48	-	-
eluiert bei pH 1,8	40	48	75

3.3.2. Gleichgewichtschromatographie der Isoinhibitoren bei pH 6,13

Um die einzelnen Isoinhibitoren noch weiter zu reinigen, wurden sie einem sehr empfindlichen Verfahren unterzogen, der Ionenaustausch-Chromatographie unter Gleichgewichtsbedingungen.

Bei dieser Methode kommt es darauf an, die Chromatographiebedingungen exakt einzuhalten. Wir bestimmten die zur Elution der Isoinhibitoren nötige Na^+ -Molarität durch Vergleich der bei der Auftrennung in Isoinhibitoren ermittelten Leitfähigkeit der einzelnen Peaks mit Hilfe einer Eichkurve.

Zu Vorversuchen wurde die so gefundene Na^+ -Molarität um ca. 20 mM Na^+ verringert; dadurch sollten saure Verunreinigungen von unserem Protein abgetrennt werden. Diese Annahme erwies sich als richtig.

3.3.2.1. Rechromatographie von Fraktion I Peak 2 bei pH 6,13

Eine Säule 1,5 x 100 cm, gefüllt mit SP-Sephadex C-25 wurde mit entgastem Puffer (50 mMol Na_2HPO_4 ; 105 mM NaCl; 0,02 % NaN_3 ; pH 6,13 eingestellt mit H_3PO_4) gründlich äquilibriert und mit 20 mg (entsprechend 53 IU) des Lyophilisats von Fraktion I Peak 2 (gelöst in 1 ml Puffer und 0,5 ml H_2O) beladen und mit dem Ausgangspuffer bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 22 ml/h - 10 ml pro Fraktion - entwickelt.

Tabelle 7

	Substanz	Puffer
pH	6,12	6,13
Leitfähigkeit (Lf)		
(Lf x 130,7) Ohm	$0,9 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$

Bei der ursprünglichen Auftrennung des Inhibitorgemisches in Isoinhibitoren (vgl. Abb. 2) konnten Peak 2 u. 3 nicht exakt voneinander getrennt werden, da sie sich, für eine Gradientenchromatographie, in den spezifischen Ladungen zu wenig unterscheiden. Wir konnten jedoch unter Gleichgewichtsbedingungen eine Trennung der beiden Isoinhibitoren und eine weitere Reinigung erzielen.

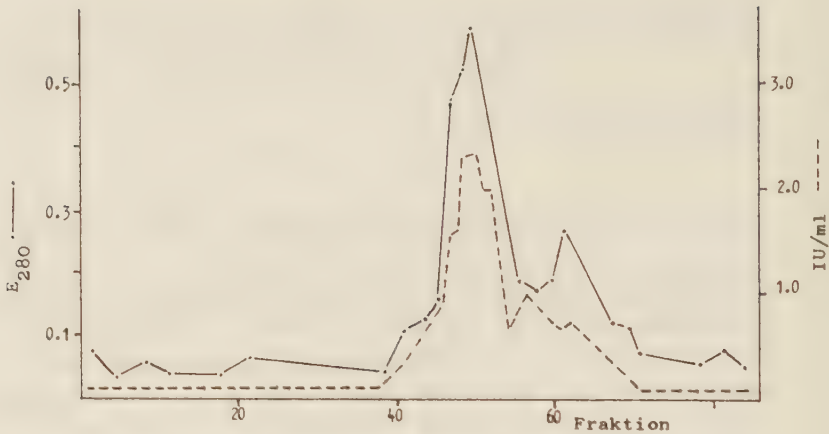


Abb. 4 Chromatographie von Peak 2 bei pH 6,13

Tabelle 8

	IU	entsprechend %
aufgetragen	53	100
eluiert Peak 2	32,1	60,4
Peak 3	12,9	24,5
Vor- und Nachfraktionen	5,3	10,0
	50,3	94,9

Die jetzt sauber getrennten Peaks wurden nach oben beschriebenen Verfahren wieder entsalzt und lyophilisiert.

3.3.2.2. Rechromatographie von Fraktion I Peak 3 bei pH 6,13

Entsprechend wie Peak 2 wurde auch Peak 3 mit dem gleichen Puffer (gleiche Na^+ -Konzentration) behandelt; auch hier zeigten sich - wie erwartet - 2 Peaks.

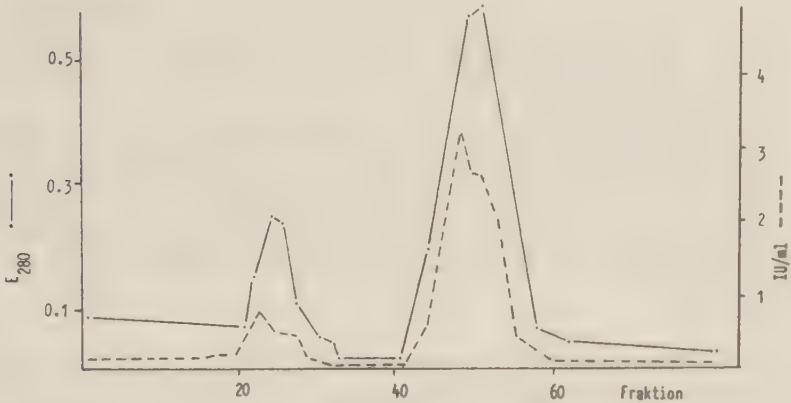


Abb. 5 Chromatographie von Peak 3 bei pH 6,13

Tabelle 9

	IU	entsprechend %
aufgetragen	86	100
eluiert Peak 2	21	24,4
Peak 3	55,3	64,1
Vor- und Nachfraktionen	6,1	7,1
	82,4	95,6

3.3.2.3. Peak 4

Der Isoinhibitor 4 ergab zu wenig Substanz und erschien zu uneinheitlich, um weiter gereinigt zu werden. Eine Weiterverarbeitung erscheint nicht lohnend.

3.3.2.4. Rechromatographie von Fraktion I Peak 5 bei pH 6,13

1040 IU von Fraktion I Peak 5 wurden gelöst in 4,2 ml Puffer (50 mM Na_2HPO_4 ; 230 mM NaCl; 0,02 % NaN_3 ; pH 6,13) und auf eine mit dem Startpuffer äquilibrierte Säule (1,5 x 100 cm; SP-Sephadex C-25) aufgetragen und unter gleichen Bedingungen entwickelt (Elutionsgeschwindigkeit 21 ml/h, 7 ml/Fraktion).

Bei 81 % Gesamtausbeute zeigte sich ein Vorpeak (I) mit 6 % Aktivität (53 IU) und ein Hauptpeak (II) mit 94 % Aktivität (790 IU) im Elutionsdiagramm.

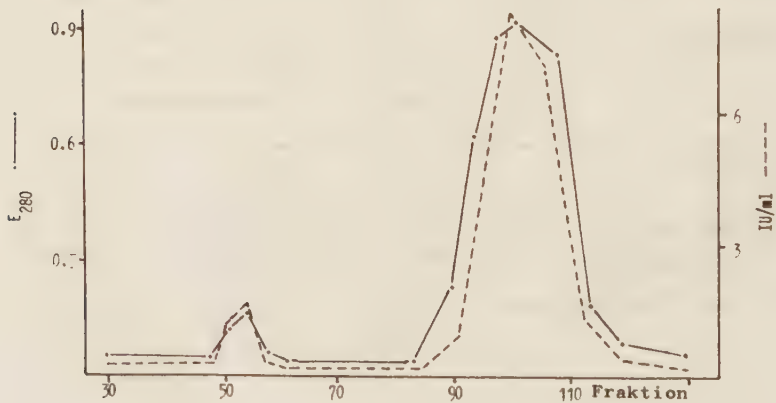


Abb. 6 Chromatographie von Peak 5 bei pH 6,13

3.3.2.5. Rechromatographie von Fraktion I Peak 6 bei pH 6,13

Auch im Elutionsdiagramm von Peak 6 zeigten sich unter folgenden Bedingungen zwei Gipfel:

Puffer: 50 mM Na_2HPO_4 ; 250 mM NaCl

Aufgetragen: 8,2 ml mit 66 IU

Ausbeute: 58,8 IU (89,1 %), davon Vorpeak (I)

12,3 IU (18,7 %)

Hauptpeak (II)

46,4 IU (70,4 %)

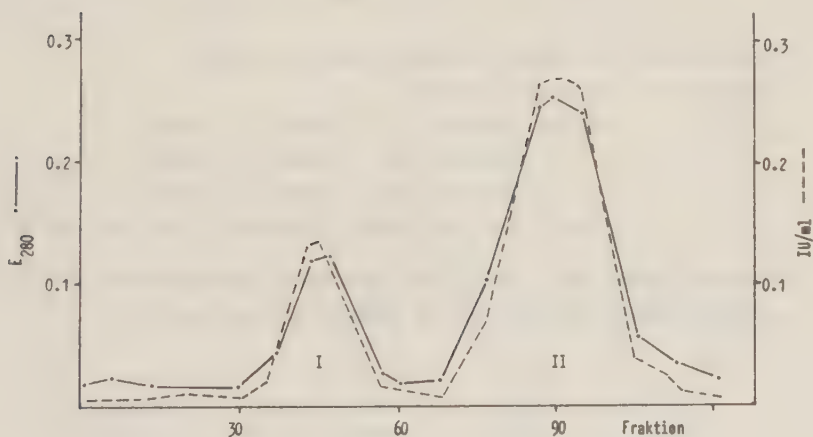


Abb. 7 Chromatographie von Peak 6 bei pH 6,13

3.3.2.6. Rechromatographie der vereinigten Teilfraktionen von Fraktion I Peak 5 und 6 bei pH 6,13

Da sowohl die Rechromatographie von Peak 5 als auch von Peak 6 zwei Gipfel aufwies und der Vorpeak (I) bei der Rechromatographie von Peak 6 zu Peak 5-II gehören könnte, wurden alle Fraktionen von Peak 5 und Peak 6 vereinigt und unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

- a) zu Gleichgewichtsbedingungen bei 320 mM Gesamt- Na^+ -Konzentration (Puffer mit 50 mM Na_2HPO_4 ; 220 mM NaCl; 1,4 l)
 - b) mit einem Gradienten von 320-350 mM Na^+ (je 220 ml)
 - c) zu Gleichgewichtsbedingungen bei 350 mM Na^+
- Die Na^+ -Molarität wurde durch Zugabe von NaCl variiert.

Aufgetragen: 91 mg/2 ml entsprechend 460 IU

Ausbeute: 449 IU (98 %)

davon Bereich I (Peak 5) 220 IU

Bereich II (Peak 5) 200 IU

Bereich III (Peak 6) 29 IU

sämtliche bei einer Molarität von 320 mM Na^+ .

Nur noch Peak 5-I, Peak 5-II und Peak 6-II konnten als selbständige Isoinhibitoren identifiziert werden.

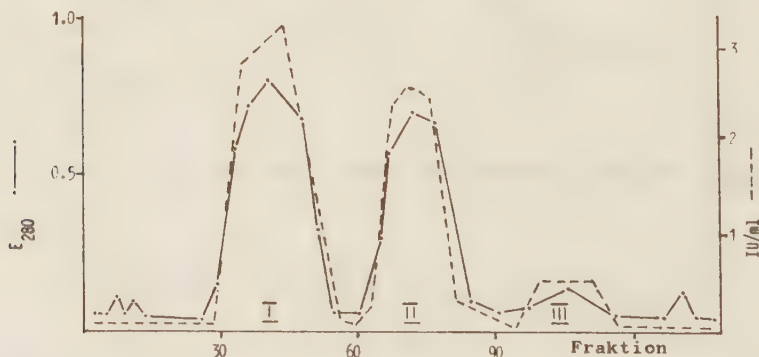


Abb. 8 Gemeinsame Chromatographie von Peak 5 und 6

3.3.2.7. Gemeinsame Rechromatographie von Fraktion I
Peak 7 und 8 bei pH 6,13

Peak 7 und 8 wurden gemeinsam unter bisherigen Bedingungen
rechromatographiert mit einem Na^+ -Gradienten von 350-900
 mM Na^+ je Liter.

Aufgetragen: 85 mg/ 2 ml (40 IU)

Eluiert: Bereich I 122 ml, entsprechend 10 IU
 (bei 470 mM Na^+)
 Bereich II 180 ml, entsprechend 14,5 IU
 (bei 510 mM Na^+)

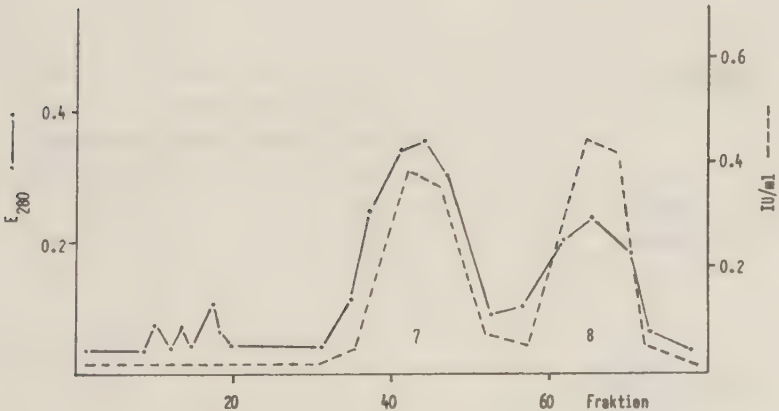


Abb. 9 Gemeinsame Chromatographie von Peak 7 und 8

3.3.3. Erneute Rechromatographie der Isoinhibitoren 3 und 5 bei pH 2,75

Peak 3 und 5 erwiesen sich als diejenigen mit der größten spezifischen Aktivität und wir versuchten deshalb, sie noch weiter zu differenzieren.

Mit H_3PO_4 werden die Isoinhibitorlösungen auf pH 2,75 titriert, wodurch die spezifische Ladung des Proteins noch stärker positiv wird. Die Carboxyl-Gruppen des Proteins werden so in die undissoziierte Form überführt, wodurch eine andersartige Bindung am Ionenaustauscher (SP-Sephadex C-25) erreicht wird.

Damit wird eine Unterscheidung der Isoinhibitoren nach ihrem Glu-Asp-Gehalt möglich.

Tabelle 10

	IP	pK der freien Carboxyl-Gruppe
L-Glu-Säure	3,22	4,25
L-Asp-Säure	2,87	3,86

Isoinhibitor 3:

39 mg Protein werden gelöst in 0,5 ml H_2O und 0,5 ml Puffer (50 mM Na_2HPO_4 , 105 mM NaCl, pH 2,75)

Aufgetragen: 155 IU

Eluiert: im Peak: 132 IU

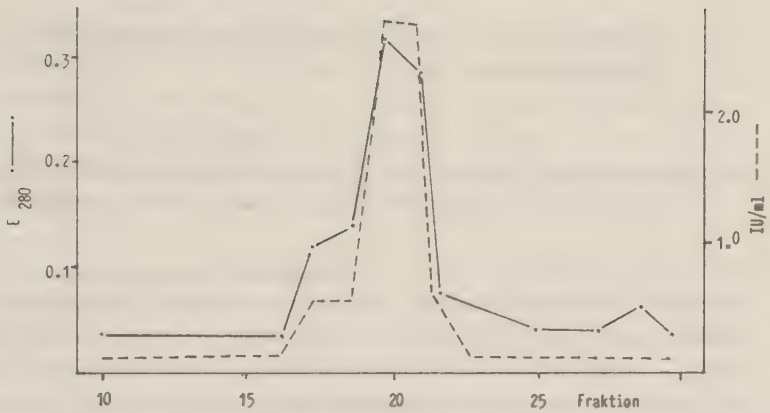


Abb. 10 Chromatographie von Peak 3 bei pH 2,75

Isoinhibitor 5:

16,5 mg Protein, entsprechend 68 IU werden gelöst und aufgetragen. Puffer: 50 mM Na_2HPO_4 , 680 mM NaCl, pH 2,75

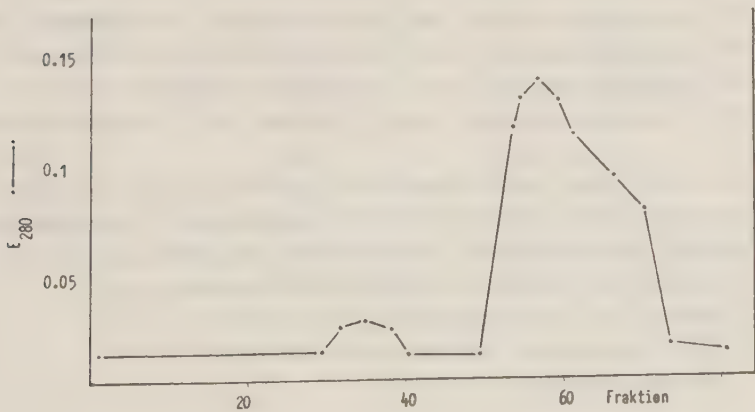


Abb. 11 Chromatographie von Peak 5 bei pH 2,75

3.4. Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung der Isoinhibitoren

3.4.1. Bestimmung der jeweils endständigen Aminosäure der Isoinhibitoren mit Hilfe des "Dansyl"-Verfahrens (38)

Beim Dansyl-Verfahren wird die endständige Aminosäure an 1-Dimethyl-aminonaphtalin-5-sulfonyl-chlorid (Dansyl-Cl) gebunden und nach Hydrolyse mit 6 N HCl vom Peptidrest getrennt. Nach Dünnschichtchromatographie über DC-Fertigfolien läßt sich die Dansyl-Aminosäure durch Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenem Aminosäuren-Standardgemisch identifizieren (34).

Verfahren:

Das Peptid wird evaporiert; nach Zugabe von 0,2 M Na HCO₃ wird erneut evaporiert und der Rückstand in 15 µl H₂O gelöst. Die Lösung wird in Hydrolysegläser mit 15 µl Dansyl-Cl (5 mg/ml in Aceton) eine Stunde lang bei 37° C inkubiert. Nach erneutem Eindampfen werden 100 µl 6 N HCl zugegeben, mit Stickstoff gespült und unter Vakuum 4 - 24 Stunden bei 105° C hydrolysiert. Anschließend wird wieder evaporiert und der Rückstand in 2 mal 100 µl der Oberphase wassergesättigten Äthylacetats gelöst und bei 80° C eingetrocknet.

Die in Methanol aufgenommenen Rückstände werden zur Dünnschichtchromatographie auf DC-Fertigfolien F 700 aufgetragen und hintereinander mit folgenden Laufmitteln beschickt:

- a) H₂O und 90 % Ameisensäure (Verhältnis 200 : 3)
- b) Benzol und Eisessig (Verhältnis 9 : 1)
- c) Äthylacetat und Methanol und Eisessig
(Verhältnis 20 : 1 : 1)

Das Auftragen der Substanzlösung auf die Folie erfolgt punktförmig in einer Ecke; deckungsgleich wird auf der Rückseite der Folie punktförmig ein Standardgemisch zur Referenz aufgetragen. Die Identifikation der gesuchten endständigen Aminosäure erfolgt durch Vergleich mit dem Standard im UV-Licht bei 254 nm.

Tabelle 11

Isocoinhibitor	zur Dünnschicht- Chromatographie aufgetragen	endständige Amino- säure
----------------	--	-----------------------------

1	4 nMol	Ile schwach *
2	4 nMol	Ile stark
3	6 nMol	Ile stark
4 (Fraktion II)	2 nMol	Ile stark und bis-Lys schwach
5 u. 6 (Frakt. I)	2 nMol	Ile stark
5 u. 6 (Frakt.II)		
(entspr.Peak 5-II)	2 nMol	Ile stark
5 u. 6 (Frakt.III)	2 nMol	keine Endgruppe
6	2 nMol	keine Endgruppe
7	2 nMol	undefinierbar
8	2 nMol	undefinierbar

* Anmerkung: Je nach Intensität mit der die Dansyl-Aminosäuren auf der Folie fluoreszieren, werden sie als schwach bzw. stark beschrieben.

3.4.2. Aminosäurenanalysen der Isoinhibitoren von Fraktion II

Die gereinigten Isoinhibitoren wurden mit 6 M HCl hydrolysiert und nach Entfernen der HCl die Aminosäuren nach SPACKMAN, STEIN und MOORE (29) mit dem BECKMAN-Multichrom-Aminosäureanalysator analysiert. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe des Infotronics-Integrators.

Tabelle 12

Aminosäuren	Isoinhibitoren:						
	1	2	3	5-I	5-II	6	8
	Aminosäuren pro Mol Protein						
Asp	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,24
Thr	1,91	1,75	1,00	1,01	0,99	1,11	1,95
Ser	4,71	3,80	4,32	3,47	3,94	3,02	3,02
Glu	4,07	4,95	5,06	4,90	5,00	3,36	2,46
Pro	3,72	2,88	2,75	2,58	2,18	1,67	2,34
Gly	8,27	6,73	6,25	6,84	6,95	5,52	6,02
Ala	2,15	2,05	1,59	2,01	1,75	2,11	3,00
Cys	5,98	5,05	4,87	4,97	5,95	2,77	3,03
Val	2,09	2,14	2,61	2,34	3,92	2,23	1,39
Meth	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 12 Fortsetzung

Amino- säuren	Isoinhibitoren:						
	1	2	3	5-I	5-II	6	8
	Aminosäuren pro Mol Protein						
Ileu	1,84	0,92	1,41	1,44	1,82	0,79	0,89
Leu	2,87	1,89	2,21	2,07	2,86	2,24	1,02
Tyr	2,16	3,43	1,81	2,31	3,94	1,64	1,69
Phe	1,39	2,37	2,08	2,91	2,99	1,94	1,07
Lys	4,46	3,70	3,63	3,64	3,76	3,05	?
His	1,98	0,99	1,80	1,05	1,00	1,24	?
Arg	4,98	4,67	5,07	6,25	6,31	4,65	4,15
Summe *	58	54	53	53	60	43	

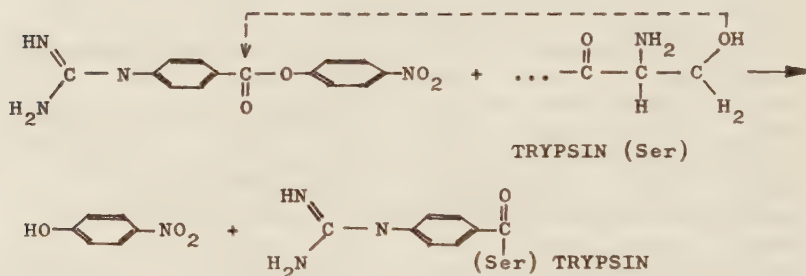
*

durch Auf- bzw. Abrunden

3.4.3. Zusätzliche Charakterisierung des Isoinhibitors 5-II durch kinetische Messungen

3.4.3.1. Bestimmung der Molarität des Trypsins mit p-Nitro- phenyl-p'-guanidinobenzoat-hydrochlorid (NPGB) (32)

NPGB ist ein gutes Titrationsmittel für Serin-Esterasen,
vor allem für Trypsin.

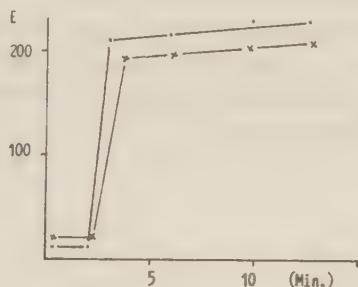


100 λ der Stammlösung Trypsin (12 mg/ml; Verd. 1 : 100)
wurden mit 2 ml 0,2 M Tra-Puffer pH 7,8 inkubiert, mit
10 μ l NPGB-Lösung versetzt und die Reaktion am Photometer
(Zeiss PMQ III) bei 410 nm verfolgt. Dabei zeigt sich
folgendes:

Nach Zugabe des Titrationsmittels erfolgt eine momentane
Extinktionsänderung von ca. 230 Extinktionseinheiten, ver-
ursacht durch die sofort einsetzende Acylierung des Serin
im Trypsin durch NPGB unter Freisetzung von p-Nitrophenolat.
Somit erlaubt die Höhe der Extinktionsänderung einen Rück-
schluß auf die Menge des vorhandenen Serins im aktiven
Zentrum und damit auf die Molarität unserer Trypsin-
Stammlösung.

Daraus konnte die wahre spezifische Aktivität des verwendeten Trypsins zu 55 % berechnet werden. Die Molarität war also nicht $4,6 \times 10^{-4}$, sondern $2,8 \times 10^{-4}$ M

Abb. 12 Titration von
Trypsin mit NPGB



3.4.3.2. Titration von Trypsin mit dem Isoinhibitor 5-II (25)

Folgende Stammlösungen wurden angemacht und während sämtlicher Testreihen beibehalten:

Isoinhibitor 5: 3 mg gelöst in 1,2 ml H_2O , entsprechend 7,3 IU/ml (spez. Akt. 2,89 IU/mg)

Trypsin (Novo): 24 mg gelöst in 2 ml 1,0 mM HCl und 0,02 M $CaCl_2$ (als Stabilisator und Schutz vor Selbstverdauung), entsprechend 0,46 μ Mol/ml (siehe 3.4.3.1.)

DL-BAPA: 1 mg/ml H_2O

Tra-Puffer: 0,2 M, pH 7,8 eingestellt mit 2 N HCl

Zur Erlangung des Hemmgleichgewichtes war eine Inkubationszeit von 10 Min. nötig.

Lösungen konstanter Trypsin-Aktivität (0,1 ml einer 1 : 100 verd. Stammlösung) wurden mit steigenden Mengen der Inhibitorlösung (0,02 bis 0,12 ml einer 1 : 100 verd. Stammlösung, entsprechend 1,46 - 8,76 mIU) plus Tra-Puffer ad 2,5 ml bei 25° C 10 Min. inkubiert und anschließend nach Zugabe des Substrates (0,5 ml BAPA) die sofort einsetzende hydrolytische Spaltung von BAPA anhand der Extinktionsänderung bei 405 nm am Photometer 10 Min. lang verfolgt.

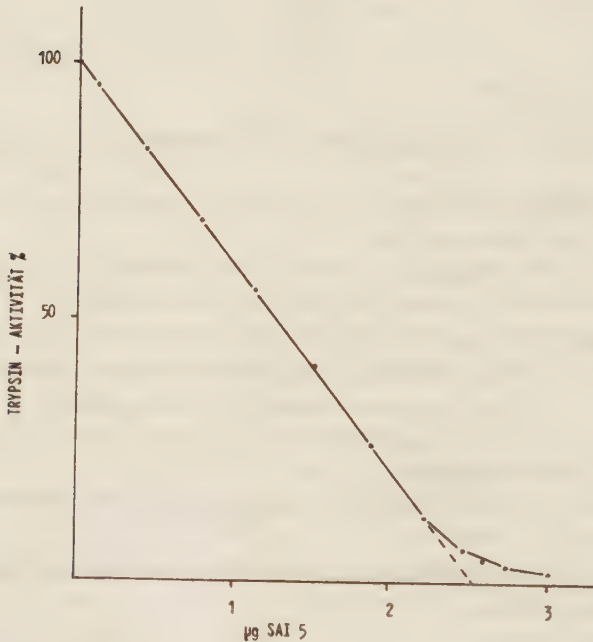


Abb. 13 Titration von Trypsin mit dem Isoinhibitor 5-II

Aus der Titrationskurve läßt sich die Dissoziationskonstante K_i nach der Methode von GREEN und WORK (33) wie folgt ableiten:

$$E \times I = E_G - E_F \quad (1)$$

$$E_F = I_F \quad (1 : 1 \text{ Komplex}) \quad (2)$$

$$K_i = \frac{(E) \times (I)}{(EI)} \quad (3)$$

Gleichung (1) eingesetzt in (3):

$$K_i = \frac{E_F \times I_F}{E_G - E_F} \quad (4)$$

Gleichung (2) eingesetzt in (4):

$$K_i = \frac{E_F^2}{E_G - E_F}$$

E_G = im Testansatz eingesetzte, gesamte Enzymkonzentration

E_F = durch Interpolation erhaltene, nach Ablauf der Reaktion noch freie Enzymkonzentration

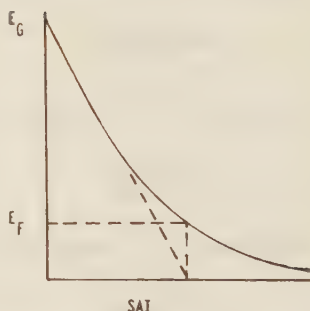
I_F = nach Ablauf der Reaktion noch freie Inhibitor-konzentration

Nach Einsetzen der Werte aus der Kurve ergibt sich als Näherungswert:

$$E_G = E_F = 96,5 \%$$

$$K_i = 3 \times 10^{-10} \text{ Mol/l}$$

Abb. 14 Schematische Darstellung der Titration von Trypsin mit dem Isoinhibitor



Da das Trypsin mit dem Isoinhibitor einen Enzym-Inhibitor-Komplex im Verhältnis 1 : 1 bildet, erlaubt die Kenntnis der wahren Trypsin-Molarität Rückschlüsse auf die Molarität der eingesetzten Inhibitorlösung und zwar nach Extrapolation der Titrationskurve auf die Abszisse.

Der molare Extinktionskoeffizient ϵ von Tyrosin beträgt bei 280 nm ca. 1250 (37). Aus der Aminosäurenanalyse (siehe 3.4.2.) wissen wir, daß der Isoinhibitor 5-II pro Mol Protein 4 Mole Tyrosin enthält, d.h. 1 Mol Inhibitor hat bei 280 nm eine Extinktion von ca. 5000. Somit kann die Molarität einer Lösung des Inhibitors durch Messung der Absorption bei 280 nm ermittelt werden.

Diese aus der spezifischen Extinktion ermittelte Molarität stimmt mit derjenigen überein, die aus der Titration des Inhibitors mit Trypsin gefunden wurde.

3.4.3.3. Titration von α -Chymotrypsin mit dem Isoinhibitor 5-II (25)

Folgende Stammlösungen wurden angemacht und während sämtlicher Testreihen beibehalten:

Enzym: α -Chymotrypsin (20 mg/100 ml 1 mM HCl),
Verdünnung 1 : 10 (30 μ l entsprechend 0,6)
Substrat: ATEE (38 mg/15 ml H₂O)
Puffer: TRA (0,067 M, 0,02 M CaCl₂, pH 7,0)
Inhibitor: Isoinhibitor 5, Verd. 1 : 100 der Stammlösung von 4.4.3.2.

Lösungen konstanter Chymotrypsinaktivität wurden mit steigenden Mengen Inhibitor und mit TRA-Puffer 10 Min. bei 25° C inkubiert und mit steigenden Mengen Substrat (0,150; 0,300; 0,450; 0,600 ml ATEE der Stammlösung) versetzt. Die Extinktionsänderungen wurden am Gerät ZEISS PMQ III in einminütigem Abstand bei einer Wellenlänge von 237 nm gemessen.

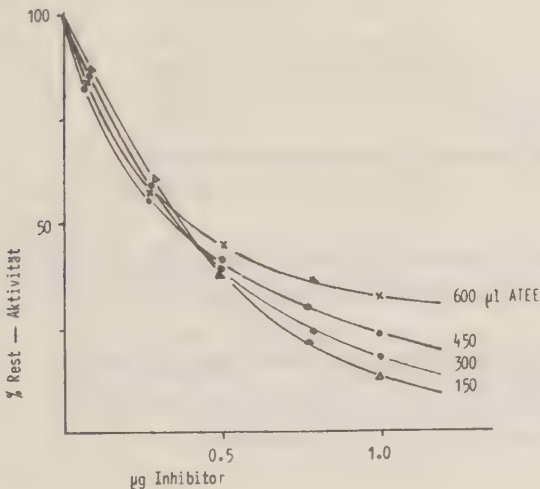


Abb. 15 Titration von Chymotrypsin mit dem Isoinhibitor 5

3.4.3.4. Bestimmung der MICHAELIS-Konstanten K_M für das System α -Chymotrypsin / ATEE

Die Michaelis-Konstante K_M von Chymotrypsin gegenüber ATEE konnte in mehreren Testreihen mit jeweils konstanten Enzym-mengen bei ansteigender Substratkonzentration ermittelt werden.

Dabei ergibt sich K_M als negativ reziproker Wert am Schnittpunkt der ohne Inhibitor bestimmten Geraden mit der Abszisse. (Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit diente die Extinktionsänderung $\Delta E/\text{min.}$ bzw. der reziproke Wert - siehe Ordinate.)

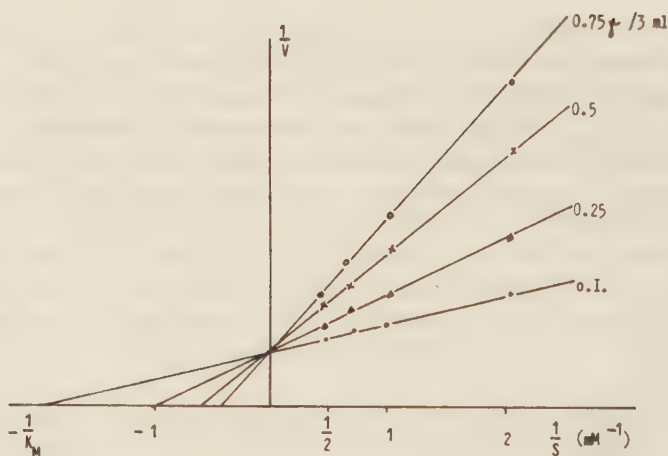


Abb. 16 Hemmung von Chymotrypsin durch den Isocaprininhibitor 5 bei wechselnder Substratkonzentration

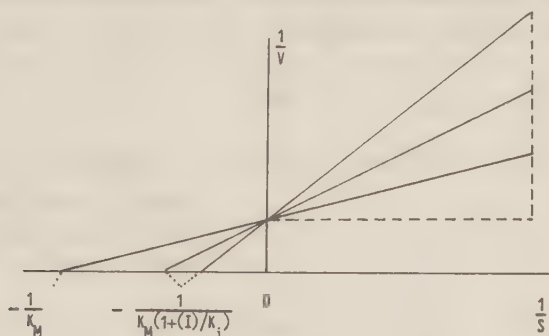
Die nach LINEWEAVER/BURK grafisch gefundene MICHAELIS-Konstante K_M beträgt $5,3 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$

3.4.3.5. Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i mit Chymotrypsin

Nach Kenntnis der MICHAELIS-Konstanten läßt sich die Dissoziationskonstante K_i nach folgenden Methoden zweifach bestimmen:

Abb. 17

Schema der
Enzymkinetik



a) mit Hilfe der Steigung:

$$\tan = \frac{1/v}{1/s} = \frac{(S)}{V} \quad (1)$$

$$\tan = \frac{K_M}{v_{\max}} \times (1 + (I)/K_i) \quad (2)$$

Durch Gleichsetzen der Gleichungen (1) und (2) erhält man:

$$\frac{(S)}{V} = \frac{K_M}{v_{\max}} \times (1 + (I)/K_i) \quad (3)$$

V = Reaktionsgeschwindigkeit

$V_{\max}$ = maximale Reaktionsgeschwindigkeit

(S) = im Testansatz enthaltene Substratkonzentration

(I) = im Testansatz enthaltene Inhibitorkonzentration

b) mit Hilfe einer Strecke t , welche definiert ist durch die Schnittpunkte zweier Geraden mit der Abszisse:

$$t = \frac{-1}{K_M \times (1 + (I)/K_i)}$$

Nach Einsetzen der aus dem LINEWEAVER-BURK Diagramm (siehe Abb. 16) zu entnehmenden Werte für

$$K_M = 5,3 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$$

$$(I) = 18 \times 10^{-9} \text{ Mol/l} \quad * \text{ ausgehend von einem Molekulargewicht von 6900 konnte nach Korrektur (siehe 3.5.) dieser Wert ermittelt werden}$$

$$(S) = 150 \times 10^{-3} \text{ Mol/l} \quad *$$

$$V = 0,3 \quad *$$

$$V_{\max} = 1,25$$

in die Gleichung (3) erhält man für die Dissoziationskonstante

$$\underline{K_i = 1,7 \times 10^{-11} \text{ Mol/l}}$$

Die Dissoziationskonstante von Chymotrypsin (Substrat ATEE) durch den Isoinhibitor 5-II unterscheidet sich von der Trypsinhemmung (Substrat BAEE) also um etwa den Faktor 20.

*

Für das Rechenbeispiel werden die Werte der Hemmkurve von 0,5 µg Inhibitor zugrunde gelegt.

3.4.3.6. Temporäre Hemmung

20 mg Seeanemonen-Isoinhibitor 5 (entsprechend 82 IU gelöst in 2 ml 50 mM Na_2HPO_4 -Puffer, pH 3,0) wurden mit 2,9 mg Trypsin, 4 Mol %, bei 25° C inkubiert und im Laufe von zwei Tagen mehrmals auf die Hemmaktivität hin überprüft.

Dabei zeigte sich eine lineare Abnahme der Hemmaktivität, d.h. der Inhibitor wurde von Trypsin innerhalb von 40 Stunden soweit abgebaut, daß nur noch 1/5 seiner Aktivität meßbar war.

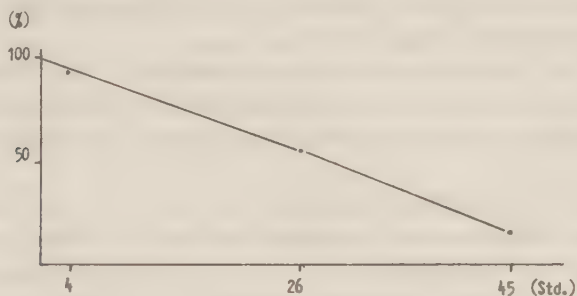


Abb. 18 Zeitlicher Verlauf der Hemmung

3.4.3.7. Aussagen über den Isoinhibitor 5

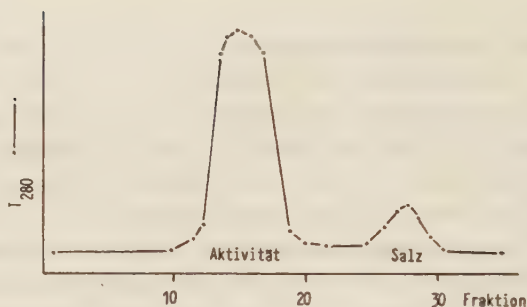
Die Zusammenfassung und der Vergleich unserer nach verschiedensten Methoden gewonnenen Ergebnisse berechtigt zu folgenden Rückschlüssen auf den Isoinhibitor 5-II:

a) auf die Molekülgröße

Der Inhibitor erscheint als symmetrischer Peak bei Gel-filtration (Seph. G-50) mit einem Molekulargewicht von ca. 6900.

Abb. 19

Gelfiltration
des Isoinhi-
bitors 5 mit
Seph. G-50



- b) auf Einheitlichkeit hinsichtlich der Ladung bei verschiedenen H^+ -Konzentrationen
- Bei der Ionenaustauschchromatographie an SP-Seph. C-25 erweist sich der bei unterschiedlichem pH mehrmals rechromatographierte Isoinhibitor 5-II als symmetrisch
- c) auf die terminale Aminosäure
- Durch "Dansylierung" ermittelten wir als einzige Endgruppe die Aminosäure Isoleucin. Dies konnte durch manuellen EDMAN-Abbau bestätigt werden, durch den die Sequenz Ile-Asn-Gly identifiziert wurde.
- d) auf die Molarität des Inhibitors
- Die Molarität, ermittelt aus dem Proteinspektrum ist identisch mit der Molarität, gefunden aus der Reaktion des Isoinhibitors mit Trypsin.
- Somit haben wir zwei unabhängige Kriterien zur Bestimmung der Molarität des Inhibitors, einmal das reaktive Zentrum, zum anderen die Extinktion der Tyrosin-Moleküle. Die Übereinstimmung der nach beiden Kriterien ermittelten Inhibitormolarität ergibt einen Anhaltspunkt für dessen spezifische Aktivität und kann als Beweis für seine Reinheit gewertet werden (d.h. die Absorption bei 280 nm wird durch Tyrosin-Moleküle des "aktiven" Inhibitors hervorgerufen).

e) auf die Aminosäuresequenz

Die Werte der Aminosäurenanalyse des Isoinhibitors 5-II sind nahezu ganzzahlig.

f) auf die nötige Korrektur der Einwaage

Aus d) ergibt sich, daß die jeweilige Einwaage des zweimal rechromatographierten und lyophilisierten Inhibitors zu 26,5 % aus Salzen und Wasser besteht und folglich um diesen Betrag zur Ermittlung der wahren Molarität korrigiert werden muß.

Die spezifische Aktivität des Isoinhibitors 5-II beträgt ohne Korrektur 2,89 IU/mg, nach Korrektur 3,93 IU/mg.

III. DISKUSSION

1. Biologie der Seeanemonen (58, 59) und Aspekte zur Physiologie der Inhibitoren

Seeanemonen gehören zu den Blumentieren (Anthozoa), der umfangreichsten Klasse der Hohltiere. Die Anthozoa werden in fünf Ordnungen unterteilt; eine davon sind die Actinaria, zu denen auch die von uns untersuchte *Anemonia sulcata* gehört. Sie leben in Küstennähe an Felswänden und lichtausgesetzten Blockfeldern.

Der Mundpol des zylinderförmigen Körpers ist von kräftigen, nesselkapselbewehrten Tentakelkränzen umgeben. Mit diesen Tentakeln fangen sie ihre Beute, die ausschließlich aus tierischer Kost besteht. Die Verdauung und Aufnahme der Nährstoffe findet nur in einer wulstartigen Kante, dem sog. Mesenterialfilament statt, während die Magentaschen nicht der Verdauung, sondern der Atmung und dem Nährstofftransport dienen.

Interessanterweise ist aber der Ort höchster Enzymkonzentration, also das Verdauungsorgan nicht zugleich der Ort mit dem höchsten Inhibitorgehalt, sondern im Gegenteil, KORTMANN beobachtete hier die geringste Inhibitorkonzentration (19).

Damit ist die These von der Schutzfunktion der Inhibitoren für das körpereigene Gewebe gegenüber den Verdauungsproteasen fragwürdig geworden. Eine weitere Erkenntnis rüttelt an dieser These: Neueste Untersuchungen an der Seenelke (*Metridium senile*) ergaben, daß diese zwar eine chymotrypsin-ähnliche Protease enthält, aber keinen Proteasen-Inhibitor (WUNDERER) und kein Toxin (BERESS)! Damit stellt sich erneut die Frage nach der physiologischen Funktion der Inhibitoren.

Ein Vergleich der Lebensweisen von *Anemonia sulcata* und *Metridium senile* erscheint dazu nützlich.

Die ökologische Umgebung ist bei beiden nicht identisch, da die Seenelke im Mittelmeer nicht heimisch ist. Für die Frage nach der Bedeutung der Inhibitoren erscheint dieser Punkt als nicht wichtig, da auch in der Nordsee inhibitorhaltige Seeanemonen vorkommen. Was die Nahrungssuche betrifft, so zählt GRZIMEK *Anemonia sulcata* zu den "Fängern", d.h. sie fangen größere Beutetiere aus ihrem Umkreis, lähmen sie und führen sie zum Mund. Die Seenelken dagegen gehören zu den "Teilchenessern", die zufällig an ihre Tentakel stoßende Kleinlebewesen mit Schleim einhüllen und zum Mund führen.

Sollte also die Funktion der Inhibitoren mit der Anwesenheit von Toxin verknüpft sein oder umgekehrt das Fehlen von Inhibitoren durch die Fähigkeit der Schleimproduktion ausgeglichen werden? Hierzu paßt auch, daß einige andere Seeanemonen-Arten eine Lebensgemeinschaft mit gewissen Fischen eingehen, wobei die Fische durch einen Schleimüberzug vor dem Nesselgift geschützt werden.

Auch eine Funktion bei der Fortpflanzung ist als Aufgabe der Inhibitoren diskutiert worden. Nachdem die Besamung bei einigen Seeanemonen-Arten im Magen der weiblichen Tiere stattfindet, könnte der Inhibitor dort eine Schutzfunktion erfüllen. Aber gerade bei *Anemonia sulcata* und *Metridium senile* erfolgt die Besamung im freien Wasser!

Anemonia sulcata beherbergt viele Zooxanthellen, das sind Algen mit denen sie in Symbiose lebt. Vielleicht liegt im Schutz dieser Algen eine Aufgabe der Inhibitoren.

Die Mehrzahl der Fische versucht peinlichst eine Berührung von *Anemonia sulcata* zu vermeiden, da sie gelähmt und gefressen werden würden.

Trotz ihrer Schutzmaßnahmen wird die Seeanemone ihrerseits von Hinterkiemenschnecken, Sonnensternen und Fischen, wie Flundern, Schellfischen und Aalen gefressen.

Um die Physiologie der Inhibitoren aus dem Bereich der Spekulation herauszuführen, ist es zuerst nötig, die genaue Lokalisation des Hemmstoffes in der lebenden Seeanemone herauszufinden. Dies wäre eine Aufgabe für nachfolgende Arbeiten und methodisch vielleicht mit Hilfe der Immunfluoreszenz zu lösen.

2. Chemie der von uns isolierten Seeanemonen-Inhibitoren

2.1. Isolierung

Die Adsorption des Rohinhibitorgemisches an CM-Cellulose bei pH 6,5 brachte eine beträchtliche Anreicherung der Inhibitoren (siehe Tab. 2). Der Überstand der Fraktion I wurde angesäuert und als Fraktion II weiter verarbeitet; hieraus konnten die basischen Toxine (Toxin II) und der Rest der Inhibitoren gewonnen werden. Die nicht gebundenen Proteine aus der Fraktion II wurden bei noch stärker saurem pH an SP-Sephadex gebunden. Diese Fraktion III enthält vor allem Toxine (Toxin I) und kaum noch Inhibitoraktivität.

Bei der Trennung des Inhibitorgemisches von Fraktion I und II mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie in neun verschiedene Isoinhibitoren ergab sich eine Übereinstimmung der Elutionsdiagramme für beide Fraktionen bei identischen Bedingungen bezüglich Elutionsvolumina, Basizität und Anzahl der Isoinhibitoren, d.h. aus Fraktion I und Fraktion II wurden die gleichen Isoinhibitoren gewonnen. Es traten in Fraktion II keine zusätzlichen sauren Isoinhibitoren auf.

2.2. Reinigung der Isoinhibitoren

Peak 1:

Die Reinigung von Peak 1 mit Trypsinharz bedarf der kritischen Betrachtung, da bei diesem Versuch außer der späteren Aminosäuren-Analyse kein Kriterium für eine wirkliche Reinigung vorliegt.

Peak 2 und 3:

Diese beiden Isoinhibitoren besitzen zu ähnliche isoelektrische Punkte, um vollständig getrennt zu werden. Auch die Chromatographie bei pH 6,13 brachte hier noch kein befriedigendes Ergebnis (siehe Abb. 4,5). Die erneute Chromatographie bei pH 2,75 bringt eine weitere Trennung, wobei die Zugehörigkeit der Schulter von Peak 3 (Abb. 10) noch unklar ist.

Peak 5 und 6:

Bei der gesonderten Chromatographie von Peak 5 bei pH 2,75 zeigte das Elutionsdiagramm (Abb. 11) zwei inhibitorhaltige Peaks, von denen der zweite noch eine Nachschulter aufwies. Auch die selbständige Chromatographie von Peak 6 ergab zwei aktive Peaks. Erst die Chromatographie der vereinten Peaks 5 und 6 brachte eine genaue Auftrennung in zwei Isoinhibitoren 5-I und 5-II und einen Isoinhibitor 6 (siehe Abb. 8).

Peak 7 und 8:

Auch diese beiden Peaks wurden vereint chromatographiert und konnten so sauber getrennt werden (siehe Abb. 9).

2.3. Ergebnisse zur Struktur

2.3.1. Endständige Aminosäuren

Die terminale Aminosäure der Isoinhibitoren 2, 3 und 5 war am eindeutigsten ausgeprägt. Alle identifizierbaren endständigen Aminosäuren waren Isoleucin. Das Fehlen der terminalen Aminosäure der Isoinhibitoren 6 bis 9 könnte auf eine Cyklisierung der Ile-Asn-Gly-Sequenz hinweisen.

2.3.2. Aminosäuren-Analysen

Die Anzahl der Aminosäuren und damit das Molekulargewicht der Isoinhibitoren 1 bis 5-II stimmt weitgehend überein.

2.3.3. Vergleich der Analysenwerte der Seeanemonen-Isoinhibitoren 1 und 5-II mit denen des BPTI, des Schneckeninhibitors und denen des Inhibitors aus Rinder-Kolostrum

Ein Vergleich gerade dieser vier Inhibitoren erscheint deshalb interessant, da alle ein ähnliches Hemmspektrum besitzen (siehe Tab. 16).

Der Vergleich der Aminosäuren-Zusammensetzung des Seeanemonen-Inhibitors mit der des BPTI und des Schneckeninhibitors zeigt überraschend weitgehende Ähnlichkeiten (siehe Tab. 14). Auch der Rinderkolostrum-Inhibitor weist mit dem BPTI eine Homologie in der Sequenz von über 40 % auf (53). Das Molekulargewicht der miteinander verglichenen Inhibitoren (ausgenommen Kolostrum-Inhibitor) liegt bei 6800, die Gesamtzahl der Aminosäuren stimmt gut überein.

Alle gegenübergestellten Inhibitoren enthalten 6 Cys. Bei allen Seeanemonen-Inhibitoren fehlt Methionin, bei den Vergleichsinhibitoren ist kein Histidin vorhanden.

Für die Gene der Inhibitoren aus Rinderpankreas, Rinderkolostrum und *Helix pomatia* wurde ein gemeinsamer phylogenetischer Ausgangspunkt postuliert, ein gemeinsames, besonders breit spezifisches Ursprungsgen. Trotz der entwicklungsgeschichtlichen Entfernung der Coelenteraten von den Mamalia fügt sich der Seeanemonen-Inhibitor sehr gut in dieses Postulat ein (vgl. auch Hemmkapazität und Hemmspektrum).

Tabelle 14

Gegenüberstellung der Aminosäuren-Analysen von Inhibitoren aus Seeanemonen (Isoinhibitor 1 und 5-II), Schnecken, Rinderpankreas und Rinderkolostrum

Amino- säuren*	SAI 1	SAI 5-II	Helix pomatia	BPTI	Kolostrum- Inhibitor
Asp	6	6	7	5	2
Thr	<u>2</u>	1	<u>2</u>	3	6
Ser	<u>5</u>	4	<u>5</u>	1	3
Glu	4	5	6	3	4
Pro	<u>4</u>	2	5	<u>4</u>	7
Gly	8	7	6	6	4
Ala	2	2	3	6	4
Cys	<u>6</u>	<u>6</u>	<u>6</u>	<u>6</u>	<u>6</u>
Val	2	4	-	1	-
Meth	-	-	1	1	1
Ile	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	1
Leu	3	3	2	2	5
Tyr	2	<u>4</u>	<u>4</u>	<u>4</u>	3
Phe	1	3	4	4	4
Lys	<u>4</u>	<u>4</u>	1	<u>4</u>	2
His	2	1	-	-	-
Arg	5	<u>6</u>	4	<u>6</u>	3
Gln	-	-	-	-	6
Asx	-	-	-	-	2
Asn	-	-	-	-	4
Summe	58	60	58	58	67

*

Zum besseren Vergleich wurden die Analysenwerte der Seeanemonen-Inhibitoren auf- bzw. abgerundet.

2.4. Hemmverhalten

2.4.1. Charakter der Hemmung

Der von uns isolierte Seeanemonen-Isoinhibitor 5-II ist ein kompetitiver Hemmstoff, was im LINEWEAVER-BURK-Diagramm (siehe Abb. 16) durch den von allen Geraden geschnittenen Ordinatenschnittpunkt einen Hinweis findet. Nach LASKOWSKI und SEALOCK ist dies sogar eine notwendige für alle Proteaseninhibitoren zu fordernde Eigenschaft (3).

2.4.2. Kinetik der Hemmung

Der Inhibitor aus *Anemonia sulcata* weist bei Inkubation mit Trypsin eine zeitlich begrenzte Hemmung auf, d.h. er gehört zu den temporären Inhibitoren.

Die Mehrzahl der niedermolekularen Inhibitoren, sowohl tierische, z.B. aus Rinderorganen, Schnecken, *Ascaris* etc., als auch pflanzliche, z.B. aus Soja- und Limabohnen, Kartoffeln, Mais etc., bewirken eine permanente Hemmung von Trypsin.

Eine temporäre Hemmung beschrieben als erste GORINI und AUDRIAN (43) an Ovomuroid aus Hühnereiklar. Später wurde dieses Phänomen auch beim sekretorischen Rinder-Inhibitor (KAZAL) (44) und bei den Seminal-Inhibitoren aus Meer-schweinchen-Samenblasen (50) und Ebersperma (47) beobachtet. Die Ursache für eine zeitlich begrenzte Hemmung ist der proteolytische Abbau der Protein-Proteinasen-Inhibitoren durch die anfangs von ihnen gehemmten Proteinasen (43, 44, 45).

Da die Eigenschaft der temporären Hemmung von der Spezifität des den Inhibitor abbauenden Enzyms abhängig ist, wäre für den Seeanemonen-Inhibitor noch zu untersuchen, ob auch die Hemmung von Chymotrypsin, Kallikrein und Plasmin zeitlich begrenzt ist.

2.4.3. Hemmkapazität

Gegenüberstellung der Hemmkapazität des Seeanemonen-Inhibitors mit derjenigen des BPTI, des Schnecken-Inhibitors und des Kolostrum-Inhibitors:

Tabelle 15

	1 µg Inhibitor hemmt µg Trypsin	Substrat
SAI 5-II	3,5	BAEE
BPTI	3,3 - 3,7 (51)	BAEE
Helix pomatia	3,5	BAPA
Rinder-Kolostrum	2,3 - 2,8 (54)	Casein

Die Hemmkapazität der Vergleichsinhibitoren liegt also in derselben Größenordnung.

2.4.4. Hemmspektrum

Gegenüberstellung mit den bekannten Vergleichsinhibitoren

Tabelle 16

	Trypsin	Chymotrypsin	Kallikrein	Plasmin
SAI 5-II	+	+	+	+
BPTI	+	+	+	+
Helix pomatia	+	+	(+)	+
Rinderkol. Inh.	+	+	-	-

Die Hemmspezifität ist sicher für die physiologische Funktion der Inhibitoren von Bedeutung.

Für den molekularen Bereich gibt es zwei Möglichkeiten der Erklärung: Das gleiche reaktive Zentrum hemmt kompetitiv mehrere Enzyme oder der Inhibitor besitzt mehrere reaktive Zentren. Für den Seeanemonen-Inhibitor kann diesbezüglich noch keine Aussage gemacht werden.

2.4.5. Stöchiometrische Hemmung

Das Molekulargewicht von Trypsin wird mit 23800 angegeben, dasjenige des Isoinhibitors 5-II beträgt 6900. Bei einer 1:1-molaren Komplexbildung zwischen Inhibitor und Enzym müßten also 3,4 µg Trypsin von 1 µg Inhibitor gehemmt werden. Dies konnte experimentell (siehe Abb. 13) gut bestätigt werden.

Aus der Hemmkurve erhält man bei 50 % Hemmung:

6 μg Trypsin entsprechen 1,25 μg Inhibitor; beide Werte korrigiert (55 % Trypsin- und 73,5 % Inhibitoraktivität) ergibt:

1 μg Inhibitor hemmt 3,5 μg Trypsin.

2.5. Reaktives Zentrum

Unter reaktivem Zentrum eines Inhibitors versteht man die Stelle des Moleküls, die bei der Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes in direkten molekularen Kontakt mit dem aktiven Zentrum des Enzyms tritt.

Die Inhibitoren der Enzyme Trypsin, Plasmin, Kallikrein und Akrosin weisen im reaktiven Zentrum Arginin oder Lysin auf (2, 13, 17, 46).

Bei Austausch von Arginin durch Lysin und umgekehrt bleibt sowohl die Aktivität als auch die Spezifität der Inhibitoren erhalten, was u.a. daraus hervorgeht, daß z.B. bei den Isoinhibitoren aus *Helix pomatia* (47) und des Tintenfisches (48) sowohl Arginin als auch Lysin im reaktiven Zentrum gefunden wurden. SEALOCK und LASKOWSKI konnten durch eine Reihe enzymatischer Reaktionen sogar einen künstlichen Austausch von Arginin durch Lysin im reaktiven Zentrum des Sojabohnen-Inhibitors von KUNITZ vornehmen und anhand von Hemmversuchen die prinzipielle Gleichwertigkeit der beiden Aminosäuren im reaktiven Zentrum demonstrieren (49, 3).

Der von uns isolierte Isoinhibitor 5-II besitzt im reaktiven Zentrum Arginin und unterscheidet sich hiermit vom BPTI, der Lysin aufweist, was aber nach obigen Ausführungen vermutlich nicht wesentlich ist.

Zur Ermittlung des reaktiven Zentrums wird ein Verfahren von FRITZ et al. (52) angewandt, bei dem an den reaktiven Seitenketten des Inhibitors chemische Modifizierungen vorgenommen werden. Acylierungsreagentien wie Citraconsäureanhydrid oder Maleinsäureanhydrid führen bei Lysin-Inhibitoren und Dicarbonylreagentien wie Cyclohexandion, Phenylglyoxal oder Butandion - welches für unseren Inhibitor benutzt wurde * - führen bei Arginin-Inhibitoren zu einer Derivatisierung und inaktivieren den Inhibitor.

*

Diese Versuche wurden dankenswerterweise von Herrn Dipl. Chem. H. Schießler für uns durchgeführt.

3. Pharmakologische Betrachtungen

Eine Vielzahl pathologischer Gewebsprozesse wird durch proteolytische Enzyme mitverursacht (24, 39). Es liegt daher nahe zu versuchen, diese Enzyme durch deren Inhibitoren therapeutisch unwirksam zu machen.

Voraussetzung für einen gezielten pharmakologischen Einsatz von Proteinase-Inhibitoren ist die genaue Kenntnis der physiologischen Funktion der Inhibitoren, ihre molekulare Wirkung und der molekulare Pathomechanismus der damit zu behandelnden Krankheiten bzw. Zustände.

Von FREY wurde 1953 erstmals der polyvalente Proteinase-Inhibitor aus Rinderorganen in die Therapie eingeführt. Von der breiten Palette anfänglicher Indikationen für BPTI (Trasylol^R u.ä.) sind nach neueren Erkenntnissen nur noch drei übrig geblieben, nämlich traumatischer Schock, Fett-embolie und Hyperfibrinolyse (55). Bei der Pankreatitis konnte im Doppelblindversuch keine Wirksamkeit beobachtet werden (55).

Bei Schockpatienten konnten FORELL, WERLE und MEYER (56, 42) zeigen, daß im Schock eine Freisetzung von Kininogenasen (Trypsin, Kallikrein) erfolgt, was zur Kininlibrierung im Blut und damit zum Blutdruckabfall führt (30, 36). Durch therapeutische Anwendung von Rinder-Inhibitoren konnten die Kininogenasen gehemmt und damit der Blutdruck normalisiert werden, was die Schockauswirkungen günstig beeinflusste.

Neueste Experimente weisen auf die pharmakologische Wirksamkeit des Inhibitors aus *Anemonia sulcata* hin. So konnten ENGLER zeigen, daß mit gereinigtem Seeanemonen-Inhibitor vorbehandelte Ratten beim künstlich herbeigeführten Verbrühungsschock eine deutlich höhere Überlebensrate haben, als nach Vorgabe einer entsprechenden Menge von Trasylol^R (57).

Was die Anwendungsmöglichkeit bei Hyperfibrinolyse betrifft, so weisen die Versuche von REICH darauf hin, daß der Seeanemonen-Inhibitor auch hier wirksam ist.

Die Vorergebnisse verschiedener Arbeitskreise lassen ferner vermuten, daß *Anemonia sulcata* nicht nur wegen der Inhibitoren, sondern auch wegen des Toxins pharmakologisch interessant sein könnte.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Eine ökologisch einheitliche Menge von Seeanemonen (Gattung *Anemonia sulcata*) wurde mit Hilfe der Gleichgewichts- und Gradientenchromatographie in neun verschiedene, aktive Isoinhibitoren und eine toxinhaltige Fraktion aufgetrennt.

Eine Reinigung der Inhibitoren erfolgte durch Gleichgewichtschromatographie bei verschiedenen pH-Werten.

Anhand der Aminosäuren-Analysen konnten weitgehende Übereinstimmungen mit Vergleichsinhibitoren aus Rinderpankreas, *Helix pomatia* und Rinderkolostrum ermittelt werden.

Auch das Hemmverhalten stimmt bezüglich Hemmspektrum und Hemmkapazität gegen Trypsin gut mit den Vergleichsinhibitoren überein.

Im Unterschied zu diesen zeigt der Seeanemonen-Inhibitor aus *Anemonia sulcata* jedoch ein temporäres Hemmverhalten. Auch das aktive Zentrum ist nicht übereinstimmend, denn es weist beim Seeanemonen-Inhibitor Arginin anstatt Lysin auf.

V. LEBENSLAUF

Am 15. Januar 1947 wurde ich als Sohn des damaligen Prokuristen Klaus Frank und seiner Ehefrau Katharina, geborene Schuller, in Rosenheim geboren.

Nach 4 Klassen Volksschule besuchte ich das Staatliche Finsterwalder-Gymnasium in Rosenheim, an dem ich 1967 das Abitur ablegte.

Nach neunmonatiger Wehr- und ebenso langem Zivilersatzdienst begann ich im Wintersemester 1969/70 mit dem Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, an der ich seither studierte.

Im Oktober 1970 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im März 1972 die ärztliche Vorprüfung ab.

Mit dem Staatsexamen nach dem Wintersemester 1974/75 beendete ich meine Studienzeit.

VI. LITERATUR

1. BERESS, L., H. KORTMANN, H. FRITZ, Z. Physiol. Chem. 353 (1972), 111 - 112
2. FRITZ, H., B. BREY, L. BERESS, Z. Physiol. Chem. 353, (1972), 19 - 30
3. LASKOWSKI, M. Jr., R. W. SEALOCK, in The Enzymes (Boyer, P. D., Hrsg.) 3. Aufl., 3 (1971), 375 - 473, Academic Press, New York
4. TAKAHASHI, H., S. IWANAGA, T. KITAGAWA, T. SUZUKI, in Second Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors (1973) München
5. VOGEL, R., I. TRAUTSCHOLD, E. WERLE, Natürliche Proteinase-Inhibitoren (1966), Gg. Thieme Verlag, Stuttgart
6. FORELL, M. M., H. STAHLHEBER, in Klinische Pathophysiologie (Siegenthaler, W., Hrsg.), 1. Aufl. (1970), 713 - 723, Gg. Thieme Verlag, Stuttgart
7. FRITZ, H., B. BREY, M. MÜLLER, M. GEBHARDT, in Proc. of the Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors (Fritz, H., und Tschesche, H., Hrsg.) (1971), 28 - 37, Walter de Gruyter, Berlin
8. ROTE LISTE (1971), Verzeichnis Pharmazeut. Spezial-Präp. (Bundesverband d. Pharm. Ind., Hrsg.), Verlag Editio Cantor, Aulendorf
9. BAYER, Leverkusen: Proteinase-Inhibitor Trasylol^R Okt. 1972 D 763/35739
10. KASELL, B., M. LASKOWSKI, Sr., Fed. Proc. 24, (1965), 593
11. DLOUHA, V., D. POSPISILOVA, B. MELOUN, F. SORM, Coll. Czech. Chem. Commun. 31 (1966), 346
12. KUNITZ, M., J. H. NORTHROP, J. Gen. Physiol. 19, (1936), 991
13. BAUER, E., E. K. FREY, H. KRAUT, F. SCHULZ, E. WERLE, Naturwissenschaften 17, (1929), 672

14. KRAUT, H., E. K. FREY, E. WERLE, Z. Physiol. Chem. 192, (1930), 1
15. HUBER, R., D. KUKLA, A. RÜHLMANN, W. STEIGEMANN, in Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors (Fritz, H. und Tschesche, H., Hrsg.) (1971), 62, Walter de Gruyter, Berlin
16. KRAUT, H., E. K. FREY, E. WERLE, F. SCHULZ, Z. Physiol. Chem. 230, (1934), 259
17. TSCHESCHE, H., T. DIETL, Eur. J. Biochem. 30, (1972), 560 - 570
18. BÉRESS, L., R. BÉRESS, Kieler Meeresforschung 27, (1971), 117 - 127
19. KORTMANN, H., H. FRITZ, in Vorbereitung
20. LASKOWSKI, M. Jr., in Sec. Int. Res. Conf., Bayer Symposium 5, (1973)
21. FRITZ, H., G. SCHORP, in Vorbereitung
22. REICH, E., persönliche Mitteilung
23. FRITZ, H., E. JAUMANN, R. MEISTER, P. PASQUAY, K. HOCHSTRASSER, E. FINK, in Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors (Fritz, H., Tschesche, H., Hrsg.) (1971), 257 - 270, Walter de Gruyter, Berlin
24. WERLE, E., 27. Tagg. Dtsch. Pharm. Ges., Wien 1962
25. FRITZ, H., I. TRAUTSCHOLD, E. WERLE, Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 2. Aufl., 1 (1970), 1012 - 1013 und 1021 - 1038
26. LEVIN, Y., M. PECHT, L. GOLDSTEIN, E. KATCHALSKI, Biochemistry 3, (1964), 1905
27. FRITZ, H., H. SCHULT, M. HUTZEL, M. WIEDEMANN, E. WERLE, Z. Physiol. Chem. 348, (1967), 308 - 312
28. FRITZ, H., H. SCHULT, M. NEUDECKER, E. WERLE, Angew. Chem. 78, (1966), 775 und Angew. Chem., int. Edit. 5, (1966), 735
29. SPACKMAN, D. H., W. H. STEIN, S. MOORE, Anal. Chem. 30, (1958), 1190

30. THAL, A. D., E. E. KOBOLD, H. J. HOLLENBERG,
Amer. J. Surg. 105 (1963), 708
31. WUNDERER, G., pers. Mitteilung
32. CHASE, T., E. SHAW, Methods Enzymol., Bd. 19, 20
33. GREEN, N. M., E. WORK, Biochem. J. 54, (1953), 347
34. WOODS, K. R., BBA 133, (1967), 369 - 370
35. Enzymkommission der Int. Union für Biochemie (1961)
36. RYAN, I. W., I. G. MOFFAT, A. G. THOMPSON, Nature 204
(1964), 1212
37. WEBSTER, M. E., I. INNERFIELD, Enzym. Biol. Clin. 3,
(1965), 129
38. GRAY, W. R., Methods in Enzymol., 11, (1967), 139
39. WERLE, E., Ärztl. Forsch. 18, (1964), 281
40. MARX, R., Thrombos. Diathes. Haemorrh., Suppl. ad
Bd. 2, (1958), Bericht 2. Symp. DAB, Heidelberg, 1956
41. MARX, R., P. CLEMENTE, E. WERLE, W. APPEL, Blut 5,
(1959), 36
42. WERLE, E., K. TAUBER, W. HARTENBACH, M. M. FORELL,
Münch. Med. Wschr., 100 (1958), 1265
43. GORINI, L., L. AUDRIAN, Biochem. Biophys. Acta 8,
(1952), 702
44. LASKOWSKI, M. Sr., F. C. WU, J. Biol. Chem. 204,
(1953), 797
45. TSCHESCHE, H., Z. Physiol. Chem. 348, (1967), 1216, 1653
46. OZAWA, K., M. LASKOWSKI Jr., J. Biol. Chem. 241,
(1966), 3955
47. FRITZ, H., H. TSCHESCHE, L. J. GREENE, E. TRUSCHEIT,
Proteinase Inhibitors, Proc. of the Second Int. Res.
Conf., Bayer Symposium 5, Springer, Berlin 1974
48. TSCHESCHE, H., A. v. RÜCKER, Z. Physiol. Chem. 354,
(1973), 1447, 1510

49. SEALOCK, R. W., M. LASKOWSKI Jr., Biochemistry 8 (1969), 3703
50. FINK, E., G. KLEIN, F. HAMMER, G. MÜLLER-BARDOFF, H. FRITZ, in Proc. of the Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors, (1971), 225, Walter de Gruyter, Berlin
51. KASELL, B., M. RADICEVIC, S. BERLOW, R. J. PEANASKY, M. LASKOWSKI, J. Biol. Chem. 238, (1963), 3274
52. FRITZ, H., E. FINK, M. GEBHARDT, K. HOCHSTRASSER, E. WERLE, Z. Physiol. Chem. 350, (1969), 933
53. CECHOVA, D., V. JONAKOVA, F. SORM, in Proc. of the Int. Res. Conf. on Inhib., (Fritz, H. und Tschesche, H. Hrsg.) Walter de Gruyter, Berlin 1971
54. KASELL, B., M. LASKOWSKI, J. Biol. Chem. 219, (1956), 203
55. KUSCHINSKY, G., Taschenbuch der modernen Arzneibehandlung, (1973), 114, 615, Gg. Thieme Verlag, Stuttgart
56. FORELL, M. M., E. WERLE, A. MEYER, 7. Int. Kongr. Inn. Med., München 1962
57. ENGLER, K., G. WUNDERER, E. WERLE, in Vorbereitung
58. GRZIMEK, B., Grzimeks Tierleben, 1, (1971), 220 - 236 Kindler Verlag, Zürich
59. KAESTNER, A., Lehrbuch der spez. Zoologie, 3. Aufl., (1969), 178 - 187, T.I, G. Fischer Verlag, Stuttgart

